

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS
MOLECULARES**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**HIDROGELES FOTOTÉRMICOS CON
APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA**

SILVIA SÁNCHEZ CASANOVA

MADRID, 2021



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

HIDROGELES FOTOTÉRMICOS CON APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA

Memoria presentada por Silvia Sánchez Casanova, Graduada en Biología, para optar al grado de Doctora

Directora

Dra. Nuria E. Vilaboa Díaz

Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ

Nuria E. Vilaboa Díaz, Doctora en Farmacia, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

CERTIFICA:

Que **Silvia Sánchez Casanova**, Graduada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "Hidrogeles fototérmicos con aplicación en ingeniería tisular ósea", que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 22 de marzo de 2021

Nuria E. Vilaboa Díaz

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por los siguientes organismos: Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ15/BIO/AI-0250), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-50364-EXP), Instituto de Salud Carlos III (PI15/01118), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-095159-B-100), la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (Convocatorias de ayudas financiadas por Roche Farma) y Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina CIBER-BBN.

A mis Padres
A mi Hermana
A Sergio

“El placer en la tarea aporta perfección al trabajo”

(Aristóteles)

RESUMEN

El empleo de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) recombinante en ingeniería tisular manifiesta graves inconvenientes relacionados con su seguridad. Debido a su baja vida media y rápida difusión, se requieren megadosis del factor de crecimiento para estimular una respuesta osteogénica eficiente, que conducen a efectos adversos. La terapia génica ofrece soluciones que permiten controlar eficientemente la producción fisiológica de factores de crecimiento. En el presente trabajo, se ha empleado una tecnología que combina sistemas de expresión transgénica inducible y materiales sensibles al infrarrojo cercano (NIR) para desarrollar una plataforma terapéutica que incrementa la producción de BMP-2 y potencia la regeneración ósea. Para ello, se integró en el genoma de células madre mesenquimales un sistema de expresión transgénica activado por calor y dependiente de dimerizador para controlar condicionalmente la producción de BMP-2. Las células modificadas genéticamente se incluyeron en hidrogeles de fibrina que contenían nanopartículas plasmónicas de oro (HGNP), capaces de transducir la energía incidente de un láser que emite en el infrarrojo cercano en calor. En presencia de dimerizador, la hipertermia inducida por la irradiación estimuló la liberación de BMP-2 bioactiva a partir de las células incluidas en los hidrogeles. Los hidrogeles fototérmicos se implantaron en un defecto óseo de tamaño crítico creado en calvaria de ratones inmunocompetentes. En los animales que fueron tratados con dimerizador, la irradiación NIR de los implantes indujo la producción de BMP-2 en la lesión ósea, dando lugar a la formación de nuevo tejido mineralizado.

Con el fin de facilitar la preparación de hidrogeles fototérmicos, se generaron HGNP recubiertas con poli-L-lisina, utilizando COOH-PEG-SH como agente de acoplamiento, lo que permitió la conjugación de trombina al nanomaterial. Las HGNP conjugadas a trombina catalizan la polimerización de la fibrina, facilitando el proceso de generación de matrices fototérmicas que transducen la energía del infrarrojo cercano en calor. Los hidrogeles resultantes se comportan como andamiaje biocompatibles que permiten, *in vitro* e *in vivo*, el control de la expresión génica activada por la hipertermia en presencia de dimerizador.

SUMMARY

Bone tissue engineering therapies based on the use of recombinant bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) have serious drawbacks in safety. Due to its short half-life and rapid diffusion, megadoses of the growth factor are required to elicit efficient osteogenic responses which may lead to adverse events. Gene delivery can control the production of physiological amounts of growth factors. In the present work, we employed a technology that combines inducible transgene expression and materials responsive to near infrared (NIR) to develop a therapeutic platform able to increase BMP-2 production and enhance bone regeneration. A heat-activated and dimerizer-dependent transgene expression system was incorporated into mesenchymal stem cells to conditionally control the secretion of BMP-2. Genetically engineered cells were entrapped in fibrin hydrogels including plasmonic hollow gold nanoparticles (HGNP) that transduce incident energy of a NIR laser into heat. In the presence of dimerizer, photoinduced hyperthermia stimulated the release of bioactive BMP-2 from NIR-responsive cell constructs. A critical size bone defect, created in calvaria of immunocompetent mice, was filled with these photothermal hydrogels. In animals that were treated with dimerizer, NIR irradiation of implants induced BMP-2 production in the bone lesion resulting in the formation of new mineralized tissue.

In order to facilitate the preparation of photothermal fibrin hydrogels, HGNP were coated with poly-L-lysine, through the use of COOH-Poly (ethylene glycol)-SH as a linker, to allow thrombin conjugation. Thrombin-conjugated HGNP conduct fibrin polymerization, facilitating the process of generating photothermal matrices which transduced energy of the near infrared into heat. The resulting NIR-responsive hydrogels can function as biocompatible scaffolds for cells capable of controlled gene expression, *in vitro* and *in vivo*, triggered by hyperthermia in the presence of dimerizer.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO | 7 |
| 1.1. Proteínas BMP | 10 |
| 2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA | 12 |
| 3. TECNOLOGÍA LÁSER y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 22 |
| 4. CONTROL DE LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA MEDIANTE HIPERTERMIA INDUCIDA POR NIR..... | 26 |
| OBJETIVOS | 31 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 1. NIR-NP | 37 |
| 1.1 Preparación y caracterización de HGNP | 37 |
| 1.2 Preparación y caracterización de HGNP acopladas a trombina | 38 |
| 1.3 Microscopía electrónica de transmisión..... | 40 |
| 2. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS | 40 |
| 3. LINEAS CELULARES..... | 41 |
| 4. HIDROGELES DE FIBRINA..... | 43 |
| 4.1 Preparación de hidrogeles de fibrina | 43 |
| 4.2. Caracterización de hidrogeles de fibrina | 44 |
| 5. ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA | 45 |
| 6. MICROSCOPIA CONFOCAL | 45 |
| 7. IMPLANTACIÓN DE HIDROGELES | 47 |
| 8. IRRADIACIÓN NIR | 48 |
| 9. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA..... | 50 |
| 10. ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA | 50 |
| 11. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA | 51 |
| 12. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES | 53 |
| 13. ENSAYOS TIPO ELISA | 54 |
| 14. HISTOLOGÍA..... | 55 |

| | |
|---|------------|
| 15. RADIOLOGÍA..... | 57 |
| 16. ESTADÍSTICA | 57 |
| RESULTADOS..... | 59 |
| 1. REGENERACIÓN ÓSEA INDUCIDA POR INTERMEDIARIOS TISULARES FOTOTÉRMICOS..... | 61 |
| 1.1 Caracterización de células C3H/10T1/2-BMP-2 ^{High} | 61 |
| 1.2 Caracterización de intermediarios tisulares fototérmicos | 63 |
| 1.3 Secreción controlada de BMP-2 en intermediarios tisulares fototérmicos | 65 |
| 1.4 Degradación de NIR-BMP-2-HG | 69 |
| 1.5 Bioactividad de BMP-2 secretada por NIR-BMP-2-HG activados..... | 72 |
| 1.6 Inducción de la expresión transgénica en lesiones óseas | 92 |
| 1.7 Secreción de BMP-2 inducida en lesiones óseas tras activación de NIR-BMP-2-HG..... | 94 |
| 1.8 Regeneración ósea tras activación de NIR-BMP-2-HG | 96 |
| 2. GENERACIÓN DE HIDROGELES FOTOTÉRMICOS BASADOS EN HGNP ACOPLADAS A TROMBINA..... | 101 |
| 2.1 Caracterización de HGNPT | 101 |
| 2.2 Polimerización de hidrogeles preparados con HGNPT | 106 |
| 2.3 Respuesta a NIR de hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT | 107 |
| 2.4 Inducción de la expresión transgénica en hidrogeles fototérmicos preparados con HGNPT | 111 |
| DISCUSIÓN..... | 117 |
| CONCLUSIONES..... | 133 |
| BIBLIOGRAFÍA | 137 |
| APÉNDICE | 169 |

ABREVIATURAS

37 °C/5 % CO₂: condiciones de incubación de cultivos a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa

AFC: fluoróforo 7-amino-4-trifluorometilcumarina

BMP: proteínas morfogénicas óseas

CuSNP: nanopartículas plasmónicas de sulfuro de cobre

C3H/10T1/2 clon 8 (ATCC-CCL-226): células multipotentes embrionarias de ratón

C3H/10T1/2-BMP-2: línea celular estable derivada de células C3H/10T1/2 que alberga en su genoma el gen *Bmp2* bajo el control del circuito activable por calor y dependiente de rapamicina

C3H/10T1/2-VEGF: línea celular estable derivada de células C3H/10T1/2 que alberga en su genoma el gen *VEGF165* bajo el control del circuito activable por calor y dependiente de rapamicina

C3H/10T1/2-fLuc: línea celular estable derivada de células C3H/10T1/2 que integran en su genoma el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control del circuito activable por calor y dependiente de rapamicina

CLSM: microscopio de barrido láser confocal

DE: desviación estándar

DMA: N, N-dimetilacetamida

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

DMEM-FBS: *Dulbecco's modified eagle medium* que contiene 10 % de suero fetal bovino previamente tratado a 56 °C durante 30 min, 1 % de L-glutamina, 100 U mL⁻¹ de penicilina y 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomicina

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EMEM: *Eagle's minimum essential medium*

EMEM-FBS: *Eagle's minimum essential medium* suplementado con 10 % suero fetal bovino previamente tratado a 56 °C durante 30 min, 1 % de L-glutamina, 100 U mL⁻¹ de penicilina y 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomicina

EthD-1: homodímero de etidio-1

Fbg-AF546: fibrinógeno humano conjugado con Alexa Flúor 546

FKBP12: *FK506-binding protein 12*

FRB: *FKBP12-rapamycin binding domain*

FRAP: *FKBP12-rapamycin-associated protein*

HGNP: nanopartículas de oro huecas

HGNP-PEG-PLL: nanopartículas de oro huecas unidas a PEG y PLL

HGNPT: nanopartículas de oro huecas conjugadas a trombina

HSE: elemento de choque térmico

HSF: factor de transcripción de choque térmico

HSP: proteína de choque térmico

fLuc: luciferasa de luciérnaga

mTOR: *mammalian target of rapamycin* diana de la rapamicina

MP-AES: espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas

NHS: N-hidroxisuccinimida

NIR: infrarrojo cercano

NP: nanopartículas

PLL: poli-L-lisina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rBMP: proteína morfogénica humana recombinante

RT: temperatura ambiente

SEM: microscopía electrónica de barrido

SPR: resonancia localizada del plasmón de superficie

TEM: microscopía electrónica de transmisión

UV-VIS-NIR: región del ultravioleta-visible-infrarrojo cercano

VEGF: factor de crecimiento vasculoendotelial humano

INTRODUCCIÓN

1. REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido dinámico, altamente vascularizado, cuya función principal es el soporte estructural del cuerpo. Además, el tejido óseo protege a los órganos internos, permite el movimiento y es un reservorio mineral. Traumatismos, infecciones o tumores derivan frecuentemente en importantes pérdidas de tejido óseo que requieren cirugías reconstructivas y/o reparadoras. Por otro lado, la incidencia de enfermedades óseas asociadas al envejecimiento, que requieren de este tipo de intervenciones, está incrementando notablemente debido al aumento de la longevidad en nuestra población. En el caso de pérdidas de grandes volúmenes de masa ósea, el tejido no es capaz de regenerarse lo que compromete su estructura y función. La magnitud de este problema se ilustra con la elevada incidencia anual en el número de fracturas totales en diferentes países pertenecientes a la Unión Europea, que en la segunda década de este siglo osciló entre 1200 y 1900 por cada 100.000 habitantes (Court-Brown y col., 2014; Driessen y col., 2016). Se estima que entre un 5 y 10 % de las fracturas experimentan un retardo en su consolidación o son incapaces de soldar. Es por ello que el tratamiento para este tipo de defectos óseos constituye un importante reto clínico y socioeconómico siendo la búsqueda de terapias efectivas que permitan la reconstrucción del tejido óseo un objetivo fundamental en cirugía ortopédica y traumatología.

Un gran número de estrategias quirúrgicas para el tratamiento de lesiones óseas están basadas en el trasplante de injertos de hueso autólogo o alogénico (Chiapasco y col., 2009; Aryal y col., 2014). Los injertos óseos autólogos constituyen el material de elección, si bien existe una importante limitación en la cantidad de tejido disponible. Por otro lado, los injertos alogénicos de hueso implican riesgos de bioseguridad que incluyen la transmisión de enfermedades infecciosas (Mickiewicz y col., 2013). La integración de hueso cortical, pobremente vascularizado y con una baja carga celular constituye un desafío en la reconstrucción de lesiones de huesos largos y craneofaciales (Bhatt y col., 2012). Estas limitaciones han propiciado la investigación de nuevas estrategias terapéuticas que permitan la reconstrucción del hueso mediante la generación *ex vivo* de intermediarios tisulares que tras su

implantación activen los mecanismos innatos de autoreparación del hueso. La ingeniería tisular ósea es un campo de estudio multidisciplinar orientado a reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido mediante el desarrollo de sustitutos biológicos (Langer y Vacanti, 1993; Dvir y col., 2010). Dichos sustitutos combinan células troncales con potencial osteoformador, materiales osteoconductores o andamiajes y factores de crecimiento osteoinductores que favorezcan la adhesión, migración y proliferación celular, garantizando una exitosa integración en los tejidos del hospedador además de facilitar su vascularización (Place y col., 2009; Murphy y col., 2013; Shiekh y col., 2018). Los factores de crecimiento se definen como proteínas biológicamente activas, secretadas por las células, que actúan sobre células dianas afectando funciones específicas relacionadas con su capacidad de proliferación y diferenciación (Zellin y col., 1998; Park y col., 2014). Forman parte de una vasta red de comunicaciones celulares que influye en procesos tan críticos como la división celular, la síntesis de la matriz extracelular y la morfogénesis (Eap y col., 2014). Muchos estudios han establecido que los factores de crecimiento desempeñan un papel vital en la consolidación de las fracturas óseas (Lieberman y col., 2002). Algunos de los factores de crecimiento más estudiados en el campo de la ingeniería tisular ósea son la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2, del inglés *bone morphogenetic protein 2*) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), que están involucrados en la osteogénesis y la angiogénesis, respectivamente (Geuze y col., 2012; Hernandez y col., 2012).

La efectividad de los protocolos de ingeniería tisular ósea depende de su capacidad para mimetizar el proceso natural de reparación de fracturas, en el que el hueso neoformado adopta la estructura, composición y vascularización del tejido al que reemplaza. Es por ello que una característica deseable de los andamiajes que componen los intermediarios tisulares es la biodegradabilidad. Lo ideal sería que un andamiaje se fabricara con materiales de degradación lenta y con la suficiente resistencia para garantizar la estabilidad estructural hasta la completa formación de un tejido funcional. Los andamiajes se diseñan como estructuras biocompatibles y altamente porosas que guían la migración

celular para favorecer una profunda colonización celular, permitiendo la difusión de nutrientes, oxígeno y desechos metabólicos. Entre los materiales de soporte mejor estudiados destacan las matrices poliméricas, que se pueden clasificar en sintéticas y naturales. Los polímeros naturales son buenos candidatos para la preparación de sustitutos biológicos, por ser biodegradables, biocompatibles, presentar un bajo coste de fabricación y escasa inmunogenicidad, si bien su comportamiento mecánico es limitado (Wubneh y col., 2018). Los mejor estudiados son el colágeno (Goh y Holmes, 2017), el quitosano, la fibroína de la seda y la fibrina. El fibrinógeno, precursor de la fibrina, es una proteína soluble del plasma. Se conforma por tres pares de cadenas de polipéptidos denominados $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, y 2γ , unidas mediante enlaces disulfuro (Weisel y Litvinov, 2017). La polimerización que da lugar a la fibrina se inicia mediante la acción de la trombina. Esta serín proteasa, cuyo peso molecular es de unos 33Kd, se genera a partir de la protrombina o factor II en una reacción catalizada por el factor Xa. La trombina ataca residuos de arginina-glicina de la cadena $\text{A}\alpha$ y de la cadena $\text{B}\beta$ del fibrinógeno, retirando fibrinopéptidos de la región central de la molécula, y convirtiendo así al fibrinógeno en un monómero de fibrina. La liberación de los fibrinopéptidos inicia la unión de los monómeros de fibrina formando oligómeros que cuando alcanzan tamaños superiores a $0,5 \mu\text{m}$ se denominan protofibrillas. Las protofibrillas se asocian entre sí, generando ramificaciones y haciendo de la fibrina una red tridimensional (Ahmad y col., 2015). Mediante la acción del sistema fibrinolítico, y en particular de la plasmina, la fibrina sufre un proceso de biodegradación (Hoppe y col., 2014), por lo que resulta un polímero muy atractivo en ingeniería tisular. La fibrina ha logrado un uso generalizado como adhesivo y sellador tisular en diversas aplicaciones clínicas destinadas a reparar tejidos dañados o facilitar el cierre de las heridas (Bao y col., 2020). Las matrices basadas en polímeros sintéticos se caracterizan por un mejor comportamiento mecánico, pero a menudo presentan baja biocompatibilidad, pudiendo dar lugar a problemas de toxicidad derivados de sus productos de degradación (Ghassemi y col., 2018).

1.1. Proteínas BMP

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son ligandos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *transforming growth factor-beta*) (Wozney y col., 1988). Su actividad se identificó por primera vez en el decenio de 1960 tras observar que la implantación ectópica de matriz ósea desmineralizada inducía la formación de hueso (Urist y Strates, 1965). Tras su aislamiento, las proteínas BMP se caracterizaron como potentes reguladores de la osteogénesis y la condrogénesis (Hanamura y col., 1980). Utilizando modelos animales de sobreexpresión y delección genética, en los últimos años se ha observado que las BMP juegan un papel crucial mucho más allá de la formación y reparación de huesos y cartílagos, desempeñando importantes funciones durante el desarrollo, por ejemplo, en la neurogénesis, (Nogami y col., 1984; Lyons y col., 1990; Jones y col., 1991), en la función cardiovascular (Lowery y col., 2010) y en la adquisición y progresión del fenotipo tumoral (Zhang y col., 2016).

Al igual que otros ligandos de TGF- β , los miembros de la familia BMP señalizan a través de dos tipos de receptores tipo serina/treonina quinasa, denominados receptores tipo I y tipo II. Los receptores canónicos de tipo I para las BMP son el receptor de activina tipo IA (ActRIA/ALK-2), el receptor de BMP tipo IA (BMPRIA/ALK-3) y el receptor de BMP tipo IB (BMPRIB/ALK-6). Respecto a los receptores de tipo II, las BMP utilizan el receptor de BMP tipo II (BMPRII), el receptor de activina tipo II (ActR-II) y los receptores de activina tipo IIB (ActR-IIB) (Miyazono y col., 2010). La naturaleza de las interacciones con los receptores varía entre las diferentes BMP. Por ejemplo, las proteínas BMP-6 y BMP-7 se unen a los receptores de tipo II antes de reclutar a los receptores de tipo I. Por el contrario, se ha postulado que las proteínas BMP-2 y BMP-4 se unirían en primer lugar a los receptores de tipo I o alternativamente, a complejos de receptores de tipo I/II previamente ensamblados (Nickel y col., 2009). Independientemente del orden de unión, tras la interacción con el ligando los receptores de tipo I y tipo II forman complejos heterotetraméricos de orden superior, en los que dos receptores de tipo II transfosforilan los dos receptores de tipo I asociados, activándolos (Wrana y col., 1994). Dicha fosforilación

conduce a la activación de diferentes vías de señalización clásicamente divididas en dos categorías: canónicas y no canónicas. La vía de señalización canónica de BMP implica a la familia de proteínas Smad (acrónimo derivado de la fusión de los acrónimos de los genes Sma de *Caenorhabditis elegans* y Mad de *Drosophila*) (Shi y col., 2003; Wang y col., 2014). En concreto, las proteínas Smad reguladas por el receptor de BMP (BR-Smad), Smad1, Smad5, Smad8, son fosforiladas y activadas por los receptores BMP de tipo I. Una vez fosforiladas, las BR-Smad se disocian de los receptores y forman complejos oligoméricos con Smad4 en el citosol (Chen y col., 1996; Shi y col., 2003), traslocándose al núcleo, donde actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de diferentes genes. Alternativamente a la vía de señalización canónica dependiente de Smad, los complejos receptores activados pueden iniciar una vía no canónica independiente de Smad que conduce a la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 MAPK (Martínez y col., 2011).

La proteína BMP-2 ha sido una de la más estudiadas de la familia de las proteínas BMP debido a su potente capacidad de inducción de la formación de hueso tanto en localizaciones ectópicas como ortotópicas (Winn y col., 1999; Gorskaya y col., 2013). Actúa como un regulador pleiotrópico que rige los pasos clave de la cascada de inducción ósea, como la quimiotaxis, la mitosis y la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia el linaje osteogénico (Jeon y col., 2008; Rivera y col., 2013). Además, juega un papel clave en la proliferación y maduración de los condrocitos durante el desarrollo del hueso endocondral (Sartori y col., 2015). Dado que la BMP-2 es una alternativa prometedora a los autoinjertos para las fracturas no unión, las fracturas abiertas de la tibia, fusiones espinales y el retardo de consolidación de fracturas (Suarez-González y col., 2013; Bae y col., 2013), su uso clínico, ya sea administrada sola o en combinación con sustitutos óseos, experimentó un considerable auge durante las dos primeras décadas de este siglo (Vukicevic y col., 2014). Con el fin de mejorar la capacidad de osteoinducción de los andamiajes, se han investigado asimismo otros factores de crecimiento que participan en el proceso natural de reparación de fracturas. Además de la BMP-2, las proteínas BMP-4 y

BMP-7 son otros miembros de la familia de las BMP con elevado potencial osteoinductor (Wozney y col., 1988), ya que promueven la formación de hueso ectópico y aceleran el proceso de osificación intramembranosa y endocondral (Reddi y col., 2001; Chen y col., 2004). Estos efectos derivan de la capacidad de estas proteínas para estimular la proliferación y quimiotaxis de células mesenquimales, promoviendo su diferenciación hacia el linaje condrocítico y osteoblástico (Wang y col., 1990; Sakou, 1998). Versiones recombinantes de las proteínas humanas BMP-2 y BMP-7 (rBMP-2 y rBMP-7) estimulan eficientemente la regeneración del hueso en varios modelos animales de defecto óseo (Groeneveld y col., 2000; Einhorn, 2003), habiendo sido aprobado su uso clínico para el tratamiento de pseudoartrosis de hueso largo (Govender y col., 2002; Dimitriou y col., 2005) y pelvis (Giannoudis y col., 2007), fracturas de tibia (Johnson y col., 1990) y en fusiones espinales (Vaccaro y col., 2008). Este tipo de medicamentos manifiestan graves inconvenientes, que dificultan su progreso como estrategia terapéutica. Se requieren altas dosis de la proteína recombinante para asegurar su bioactividad ya que presentan vidas medias muy cortas, no existen métodos eficientes para asegurar su biodisponibilidad a medio y largo plazo únicamente en el sitio de la lesión ya que difunden de forma pasiva desde el lugar de implantación, y su coste es muy elevado (Garrison y col., 2007). La difusión incontrolada de estas proteínas a tejidos circundantes implica un alto riesgo de daño colateral tras el tratamiento como puede ser la osificación heterotópica en fracturas de tibia (Axelrad y col., 2008) o manifestación de osteolisis (Helgeson y col., 2011). Estos inconvenientes hacen evidente la necesidad de controlar el marco espacio-temporal de bioactividad de estos factores de crecimiento.

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA

La terapia génica se revela como una alternativa prometedora capaz de superar las limitaciones manifestadas por los tratamientos que emplean proteínas recombinantes para promover regeneración ósea. La terapia génica *in vivo* administra directamente el transgén mientras que la terapia génica *ex vivo*

administra una población celular en la que se ha insertado *in vitro* el transgén de interés (Wehling, 2001). A diferencia de las terapias basadas en proteínas, la terapia génica posibilita la producción sostenida en el tiempo de cantidades fisiológicas de factores de crecimiento. Por consiguiente, puede ofrecer una solución clínica más eficiente para aquellas lesiones óseas que se tratan actualmente con rBMP (Kimelman y col., 2007).

La mayor parte de los estudios en que se ha explorado la sobreexpresión de transgenes que codifican factores de crecimiento utilizan estrategias basadas en el uso de promotores constitutivamente activos, que no permiten regular la magnitud ni duración de expresión del transgén, ni su localización específica. Dado que en muchas situaciones patológicas es deseable que los transgenes terapéuticos se expresen únicamente durante el periodo de tiempo requerido para que ejerzan un efecto óptimo, silenciándose posteriormente, se han desarrollado múltiples sistemas que permiten regular la duración de la expresión de transgenes. La mayoría de estos sistemas están basados en a) un factor de transcripción cuya actividad está condicionada a la presencia o ausencia de un ligando y b) un promotor que responde al factor de transcripción activado y controla la expresión del transgén (Vilaboa y col., 2006; Vilaboa y col., 2011). En estos sistemas, la ventana temporal de expresión transgénica está condicionada por la presencia o ausencia del ligando. Ejemplos de estos circuitos son los que responden a tetraciclina, basados en los elementos reguladores que controlan el operón de resistencia a tetraciclina en bacterias (Hillen y Wissman, 1989) o los que responden a antagonistas del receptor de progesterona como la mifepristona o ulipristal (Wang y col., 1997). Otro tipo son los que utilizan transactivadores heterodiméricos en los que el dominio de unión al ADN y el de transactivación se expresan de forma independiente y carecen de afinidad entre sí. En presencia de un ligando específico del sistema, ambos módulos dimerizan posibilitando la formación de un transactivador funcional con capacidad para activar el promotor que controla la expresión del transgén terapéutico (Rivera y col., 1996). Uno de estos sistemas, que utiliza como ligando la rapamicina, se ha explorado para controlar la expresión de factores de crecimiento como BMP-2, mediante una aproximación *ex vivo* (Koh y col., 2006). El circuito dependiente de rapamicina

fue introducido en el genoma de fibroblastos para controlar la expresión de BMP-2. Los experimentos *in vitro* demostraron que en ausencia de ligando no se detectaba secreción de BMP-2 mientras que al tratar los cultivos con rapamicina se inducía la expresión del transgén, siendo secretada BMP-2 por las células de forma dependiente a la dosis empleada. Los subsiguientes experimentos *in vivo* mostraron formación de hueso mineralizado tras implantar intermediarios tisulares conteniendo los fibroblastos modificados genéticamente en defectos óseos de ratones inmunocompetentes a los que se les administró rapamicina intraperitonealmente, cada 48 h durante 6 semanas.

De forma general, la mayoría de los vectores empleados en terapia génica carecen de la capacidad para suministrar los transgenes de forma exclusiva a aquellos tejidos, células u órganos que requieren tratamiento (Vilaboa y col., 2006; Vilaboa y col., 2011). Experimentos realizados hace más de dos décadas demostraron que incluso tras la administración directa de un vector adenoviral en un tejido diana, dicho vector se disemina rápidamente ganando acceso a órganos que no son objeto del tratamiento y acumulándose en algunos de ellos al mismo nivel que en el órgano en el que se había administrado (Bramson y col., 1997). Dependiendo de la naturaleza de los transgenes, esta diseminación incontrolada puede ocasionar importantes problemas de toxicidad, por ejemplo, si codifican proteínas citotóxicas utilizadas en terapias antitumorales o potentes factores de crecimiento con acciones pleiotrópicas. Con el fin de paliar este problema, se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar vectores con una mayor selectividad o afinidad por el tejido diana, si bien no se ha podido identificar vehículos totalmente específicos. Una de las estrategias más eficaces para evitar efectos secundarios derivados de una diseminación incontrolada de los vectores contempla el control transcripcional de la expresión transgénica únicamente en las células o tejidos necesitados de terapia (Robson y col., 2003; Vilaboa y col., 2006; Vilaboa y col., 2011). Así, se ha explorado el uso de promotores específicos de tipo celular o tejido (Beck y col., 2004; Melo y col., 2004; Li y col., 2006; Messina y col., 2007; Chen y col., 2012; Yu y col., 2013). Sin embargo, estas aproximaciones presentan importantes limitaciones derivadas de la ausencia de total

especificidad de los promotores, de la dificultad para modular el nivel de activación del promotor y de la necesidad de usar diferentes promotores para cada órgano o tejido diana. Como alternativa, se ha explorado el uso de promotores que responden a estímulos físicos, por ejemplo, radiación ionizante, luz o elevación de temperatura. Estos promotores pueden ser localmente activados en, virtualmente, cualquier tejido y presentan la ventaja de poder ser controlados de forma no invasiva en el órgano diana (Vilaboa y col., 2006; Vilaboa y col., 2011). Debido a su toxicidad, las estrategias que emplean radiaciones ionizantes quedan restringidas al ámbito de la terapia antitumoral. Como ejemplo, el promotor del gen *EGR1* se ha empleado en combinación con radioterapia para sobreexpresar el factor de necrosis tumoral en diferentes tumores sólidos (Weichselbaum y Kufe, 2009; Chang y col., 2012; Hecht y col., 2012). En cuanto a los sistemas que utilizan luz, se han generado circuitos activables por luz visible azul (Ye y col., 2011; Wang y col., 2012; Polstein y col., 2012; Konermann y col., 2013), roja (Müller y col., 2013) y ultravioleta-B (Müller y col., 2013b) que inducen los transgenes tras la iluminación de la zona de interés. La mayoría de estos sistemas utilizan componentes no humanizados y a menudo requieren la administración de cromóforos exógenos (Shimizu-Sato y col., 2002; Müller y col., 2013), pudiendo derivar en problemas de inmunogenicidad o toxicidad. Su mayor limitación proviene de la baja penetración de luz. Incluso cuando la iluminación en tejidos profundos se consigue implantando una fibra óptica, la expresión transgénica se reduce a unos pocos milímetros desde la fuente óptica (Wang y col., 2012).

Los sistemas que se inducen mediante un incremento de temperatura emplean promotores de genes de estrés o de choque térmico (HSP, del inglés *heat shock protein*). Los genes *HSP* codifican la familia de proteínas Hsps, que se acumulan transitoriamente en respuesta a agentes que inducen desnaturalización proteica, siendo la elevación de temperatura el estímulo mejor estudiado (Voellmy y col., 1985). Estos promotores contienen elementos de choque térmico (HSE, del inglés *heat shock element*) caracterizados por tres o más repeticiones de la secuencia pentamérica 5'-nGAAn-3', reconocidas por los factores de transcripción de choque térmico (HSF, del inglés *heat shock factor*)

que actúan como activadores transcripcionales (Schiller y col., 1988). En células de mamíferos se expresan varios tipos de HSF, siendo HSF1 el que ejerce un papel dominante durante el proceso de estrés celular. En células deficientes en HSF1, no se observa la inducción por calor de la expresión de los genes *HSP* (McMillan y col., 1998). En condiciones fisiológicas HSF1 se encuentra como monómero en el citoplasma, formando complejos con diferentes chaperonas y co-chaperonas que le mantienen en un estado inactivo (Voellmy y col., 2004). La exposición a estrés libera HSF1 del complejo represor, induciendo su homotrimerización y translocación al núcleo donde se une a los HSE presentes en los promotores de genes *HSP*, adquiere capacidad transcripcional e induce la expresión de genes *HSP*. La magnitud de la activación de estos promotores es proporcional a la intensidad del estímulo inductor. En lo que se refiere al estímulo térmico, su intensidad es función tanto del incremento de temperatura como del tiempo de exposición. Cuando el estímulo térmico se atenúa, HSF1 se transloca de nuevo al citoplasma mediante un proceso no totalmente dilucidado (Neef y col., 2011), inactivándose los promotores de los genes *HSP*. Uno de los promotores más inducibles es el del pseudogen humano *HSP70B* (*HSPA7*) que presenta una actividad basal a 37 °C muy reducida y se induce cientos de veces tras estimulación térmica (Voellmy y col., 1985). Desde la década de los 90 se ha explorado la posibilidad de utilizar este promotor para el control espacial de la expresión de una gran variedad de transgenes (Vilaboa y Voellmy, 2006; Vilaboa y col., 2011). Los métodos para administrar calor oscilan desde los más sencillos, basados en el contacto con superficies o líquidos a determinadas temperaturas, hasta los más complejos que utilizan microondas (Fujita y col., 2012), radiación infrarroja (Deguchi y col., 2009) y ultrasonidos (Guilhon y col., 2003; Deckers y col., 2009) y permiten administrar el calor de forma no invasiva y, en determinados casos, de forma focalizada en el órgano o tejido diana.

Tanto las cinéticas de activación de los promotores *HSP* como las de su posterior desactivación están definidas por mecanismos endógenos de regulación y, por tanto, su actividad puede no ajustarse al perfil de expresión temporal que requiera la terapia. Así, la activación de los promotores de genes *HSP* es reversible, silenciándose horas después del tratamiento térmico

activador, lo que limita su utilidad cuando se requiera inducir un transgén durante un periodo de tiempo prolongado. Un problema más importante lo constituye la eventual activación no planificada del promotor a consecuencia de un aumento en la temperatura corporal asociada a procesos febriles, ejercicio extenuante o a la administración de determinados fármacos, lo que resultaría en la expresión no intencionada del transgén (Locke y col., 1995; Venkateshan y Marquet, 1996; Salminen y col., 1997; Moseley, 1998; Shastry y col., 2002). Con el fin de solventar ambos problemas, nuestro grupo desarrolló circuitos génicos basados en el promotor *HSP70B* y un transactivador regulable por ligando. Estos sistemas proporcionan un grado de control superior sobre la actividad transgénica que aquellos que únicamente emplean un promotor inducible *HSP* (Fig. 1) (Vilaboa y col., 2005; Martin-Saavedra y col., 2013).

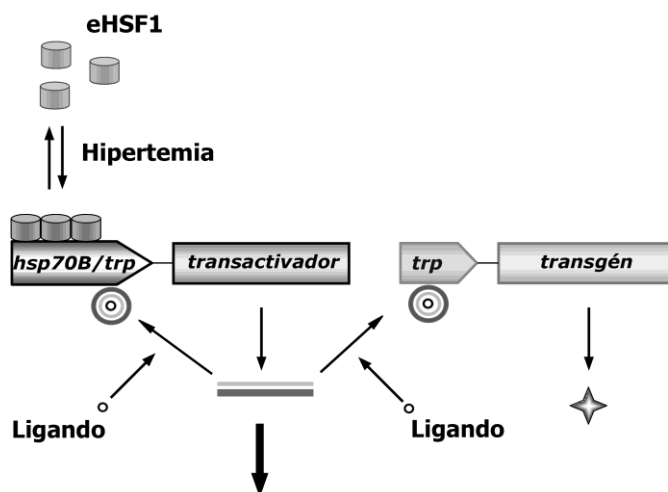


Figura 1. Circuito de genes activado por calor y dependiente de ligandos. El circuito se compone de un transactivador controlado por un promotor híbrido que contiene componentes del promotor *HSP70B* y de un promotor *trp* (del inglés, *transactivator-responsive promoter*) que se regula por el transactivador activado. La expresión del transgén de interés está controlada por un promotor *trp*. Tras un incremento de temperatura el transactivador se expresa y, en presencia del ligando específico del sistema, adquiere capacidad transcripcional activando tanto el promotor híbrido que regula su propia expresión como el promotor que regula la expresión del transgén de interés. La flecha gruesa en negrita indica la degradación del transactivador. eHSF1: HSF1 endógeno. Adaptado de Vilaboa y Voellmy (2015).

El primer componente de estos circuitos está formado por un promotor híbrido que combina secuencias del promotor del gen *HSP70B* y secuencias de reconocimiento de un transactivador regulable por ligando. El estímulo térmico

induce la actividad del promotor híbrido, incrementando la expresión del transactivador controlado por dicho promotor. En presencia del ligando específico del sistema, el transactivador adquiere capacidad transcripcional, activando tanto al promotor que controla la expresión del transgén de interés como al promotor híbrido que dirige su propia expresión. Este sistema de retroalimentación positiva asegura que la expresión transgénica, una vez inducida, se mantenga en tanto en cuanto el ligando esté presente, inactivándose al interrumpir el suministro del ligando al sistema biológico. Por otro lado, el hecho de que el promotor híbrido emplee secuencias del promotor *HSP70B* implica que la magnitud de la expresión transgénica pueda modularse en virtud de la intensidad del tratamiento térmico (Vilaboa y col., 2005; Martín-Saavedra y col., 2013). El diseño de este tipo de circuitos evita los problemas de inducción transitoria y no planificada de la expresión transgénica, inherentes al empleo de promotores *HSP*. Un primer circuito utilizaba transactivadores activables por antagonistas del receptor de progesterona como la mifepristona o ulipristal para regular la expresión transgénica (Vilaboa y col., 2005; Vilaboa y col., 2011; Voellmy y col., 2015; Vilaboa y col., 2015; Voellmy y col., 2020). Posteriormente se generó un segundo circuito que utiliza transactivadores dependientes del dimerizador rapamicina (Martín-Saavedra y col., 2009; Martín-Saavedra y col., 2013) (Fig. 2).

El transactivador de este sistema está formado por dos módulos. El primer módulo integra 3 copias en tándem de la proteína de unión a la inmunofilina FKBP12, (del inglés, *FK506-binding protein 12*) fusionadas a la proteína ZFHD1, que contiene dominios de dedo de cinc y de unión a sitios de reconocimiento en el ADN que presentan la secuencia TAATTANGGGNG (Pomerantz y col., 1995). El segundo módulo incluye FRB, un dominio de 100 residuos de la proteína FRAP (del inglés, *FKBP rapamycin-associated protein*) humana, con capacidad de unión al complejo rapamicina-FKBP12. En este segundo módulo, FRB está fusionado a una combinación de dominios de activación transcripcional de los factores p65 y de HSF1 (Pollock y col., 2000). En este sistema, los componentes esenciales que constituyen el factor de transcripción, es decir, el dominio de unión al ADN y el dominio de activación

transcripcional se distribuyen en dos módulos que carecen de afinidad alguna y que integran FKBP12 y secuencias de reconocimiento del complejo FKBP12-rapamicina, respectivamente. Únicamente en presencia de rapamicina los dos módulos dimerizan, generando un factor de transcripción funcional. En este tipo de circuito la expresión de los dos módulos que integran el factor de transcripción se mantiene mediante los sitios de unión de ZFHD1 presentes en el promotor híbrido *HSP70B/Z12* mientras que la expresión del transgén de interés está controlada por los sitios de unión de ZFHD1 fusionados al promotor mínimo de IL-2.

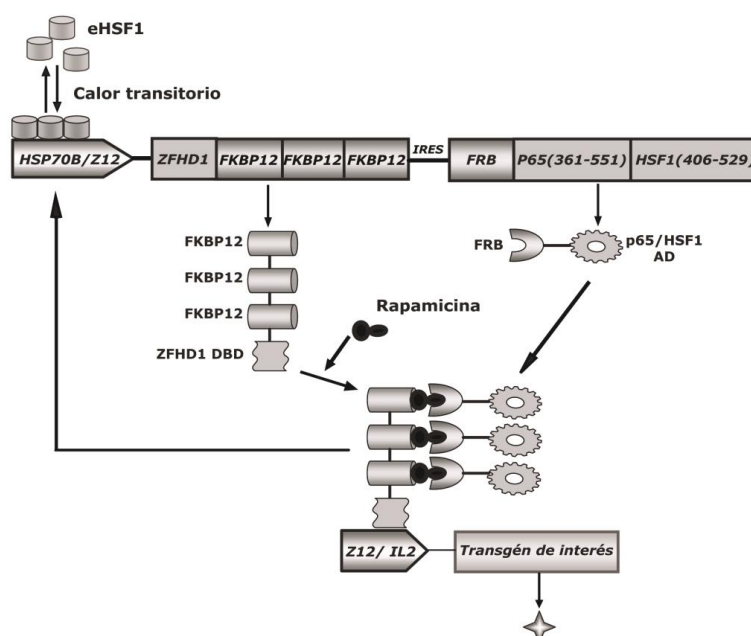


Figura 2. Esquema del circuito genético activado por calor y dependiente de rapamicina para controlar la expresión del transgén de interés. El primer componente del circuito genético está formado por un promotor híbrido *HSP70B/Z12*, que combina un promotor *HSP70B* y 12 elementos de reconocimiento de la proteína de fusión ZFHD1 (Z12), y conduce la expresión de un gen bicistónico que codifica los dos módulos de un transactivador regulado por rapamicina. Un módulo contiene 3 copias en tándem de FKBP12, y la proteína de fusión ZFHD1 que contiene dos dominios de dedo de zinc del factor de transcripción humano Zif268 unidos a un homeodominio derivado del factor de transcripción humano Oct-1. Un segundo módulo contiene FRB, un fragmento de 100 aminoácidos de FRAP (del inglés, FKBP *rapamycin-associated protein*) humana, con capacidad de unión al complejo FKBP12-rapamicina, así como dominios de activación transcripcional de los genes *RELA* (p65) y *HSF1*. El segundo componente del circuito genético está compuesto por 12 elementos de reconocimiento de ZFHD1 fusionados a un promotor mínimo de interleuquina 2 (Z12/IL2) que responden al transactivador activado por rapamicina para dirigir la expresión de un transgén de interés. El promotor híbrido *HSP70B/Z12* responde tanto al HSF1 endógeno activado por calor como al transactivador activado por rapamicina. p65: factor de transcripción p65, HSF1: factor de transcripción de factor de choque térmico 1, eHSF 1: HSF1 endógeno. AD: dominio de activación. DBD: dominio de unión del ADN. IRES: sitio de entrada al ribosoma interno. Adaptado de Vilaboa y Voellmy (2015).

Para determinar *in vitro* la funcionalidad de este sistema de expresión, se generó mediante transfección estable la línea celular C3H/10T1/2-fLuc, derivada de células multipotentes embrionarias de ratón C3H/10T1/2. Las células C3H/10T1/2-fLuc integran en su genoma un gen reportero de luciferasa (fLuc) bajo el control del circuito activable por calor y dependiente de rapamicina. No se observó actividad fLuc en células cultivadas a 37 °C, ni en ausencia ni presencia de rapamicina, ni tampoco cuando las células se sometieron a choque térmico en ausencia del dimerizador. Sin embargo, un tratamiento a 45 °C durante 30 min en presencia de rapamicina dio lugar a un fuerte incremento de la actividad luciferasa. Se observó que el grado de inducción de la expresión transgénica era dependiente de la intensidad del estímulo térmico y de la concentración del dimerizador (Martín-Saavedra y col., 2013). Subsiguientes experimentos *in vivo* empleando estas mismas células que fueron implantadas subcutáneamente en ratones C3H/HeNRj indicaron que el sistema podía ser inducido en la zona de implantación mediante aplicación local de calor exclusivamente en aquellos animales tratados con rapamicina, pero no en aquellos a los que se administró vehículo, ni tampoco en aquellos que no fueron sometidos a tratamiento térmico, pero recibieron dimerizador. Con el fin de evaluar si el sistema podía ser eficaz para controlar la inducción de un factor de crecimiento, se generaron de forma similar células C3H/10T1/2-VEGF derivadas de C3H/10T1/2, que albergaban en su genoma el gen *VEGF165* bajo el control del circuito activable por calor y dependiente de rapamicina. Las células se implantaron subcutáneamente en ratones C3H/HeNRj que fueron tratados con rapamicina y sometidos a tratamiento térmico local a 44,5 °C durante 25 min, observándose al cabo de 3 y 7 días una fuerte respuesta angiogénica en la zona implantada, atribuible a la producción de VEGF (Martín-Saavedra y col., 2013). Esta respuesta angiogénica no pudo ser objetivada en animales que no recibieron rapamicina, ni en los que la recibieron en ausencia de tratamiento térmico.

La rapamicina es un agente inmunosupresor comercializado con el nombre de Rapamune, que interactúa con la inmunofilina FKBP12. El complejo rapamicina-FKBP12 se asocia específicamente al dominio FRB de la proteína mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*) (Liang y col., 1999;

Banaszynski y col., 2005). mTOR es una proteína quinasa que participa en procesos de supervivencia y proliferación celular (Abraham, 1998; Lee y col., 2007). La interacción del complejo rapamicina-FKBP12 con mTOR inhibe diferentes rutas de señalización efectoras dependientes de mTOR (Sarbasov y col., 2005). Dado que la rapamicina inhibe la proliferación de células T, induciendo inmunosupresión, se aprobó inicialmente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos en el año 1999 para el tratamiento preventivo del rechazo agudo, en combinación con esteroides y ciclosporina. Un año más tarde, el fármaco fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos como una alternativa a los antagonistas de la calcineurina en la terapia a largo plazo para evitar el rechazo de trasplantes. A nivel experimental, ha demostrado efectos protectores contra la prevención del envejecimiento, inhibición del crecimiento de tumores, regulación del crecimiento de las células endoteliales, e inhibición de la diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, entre otros (Chanika y col., 2009). La rapamicina también juega un papel importante en la homeostasis ósea a través de S6K1, efector de mTOR que regula la condrogénesis. La inhibición de mTOR por la rapamicina aumenta la expresión de NF- κ B (del inglés, *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*), que juega un papel importante en la diferenciación de osteoclastos mientras que en otros tipos celulares presentes en el estroma óseo modula la expresión de RANKL (del inglés, *receptor activator for nuclear factor κ B ligand*), M-CSF (del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*) y del factor de necrosis tumoral α (TNF α), resultando en efectos que oscilan desde la inhibición hasta la estimulación de la formación ósea (Singha y col., 2008; Lee y col., 2010; Yeh y col., 2013; Chen y col., 2018).

Los circuitos génicos que emplean como ligando la rapamicina generan cierto recelo, derivado de las propiedades inmunosupresoras del dimerizador. Por ello, se ha realizado un importante esfuerzo para identificar derivados de la rapamicina, denominados rapálogos, que han reducido sustancialmente la actividad inmunosupresora de la molécula original, a la vez que retienen la capacidad de heterodimerización del transactivador quimérico (Indraccolo y col.,

2006). La activación de los circuitos dependientes de rapamicina utilizando estos rapálogos requiere que el dominio FRB del transactivador presente una sustitución de Thr por Leu en la posición 2098 (Pollock y col., 2002; Toniatti y col., 2004). Ensayos de nuestro grupo de investigación indicaron que la actividad transgénica controlada por el circuito activable por calor y dependiente de rapamicina se inducía tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se utilizaba rapamicina o el rapálogo AP21967. Se obtuvieron resultados similares en cuanto al grado de actividad transgénica alcanzada, si bien la potencia del rapálogo como agente inductor fue aproximadamente unas cinco veces menor que la de la rapamicina (Martín-Saavedra y col., 2013).

3. TECNOLOGÍA LÁSER y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

El láser (del inglés, *light amplification by stimulated emission of radiation*) utiliza un efecto de la mecánica cuántica, la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz monocromático y coherente tanto espacial como temporalmente. La coherencia espacial se relaciona con el mantenimiento de la direccionalidad del haz y la coherencia temporal proviene de su naturaleza de radiación monocromática que presenta la misma fase, frecuencia y amplitud. Los fundamentos teóricos del láser fueron descritos por primera vez por Einstein en 1917, y más tarde por Townes, Gennadiyevich y Mikhailovich en el decenio de 1950, a quienes se les concedió colectivamente el Premio Nobel de Física en 1964 por su labor fundamental en la física cuántica. En 1960 Theodore Maiman desarrolló el primer láser funcional en los Laboratorios Bell, un dispositivo basado en rubí capaz de generar una radiación electromagnética relativamente uniforme en cuanto a longitud de onda, fase y polarización (Maiman, 1960).

El hecho de que el láser sea una tecnología tan atractiva se debe a su capacidad para generar un haz de fotones con una sola longitud de onda, colimado, coherente y de alta energía (Franck y col., 2016). Las particularidades de la radiación láser han sido explotadas para su uso en diferentes aplicaciones biomédicas, dependiendo de su alta o baja intensidad, en cirugía o cicatrización de heridas respectivamente (Migliario y col., 2018). La mayoría de los láseres

que se utilizan en medicina generan luz dentro del rango visible, del infrarrojo cercano (NIR, del inglés *near infrared*) (750-1350 nm), del infrarrojo medio (1,4-3 μm), del infrarrojo ($>3 \mu\text{m}$) y, más raramente, del rango ultravioleta (200-400 nm) (Allemann y Kaufman, 2011). Tras su interacción con los tejidos, la luz láser experimenta fenómenos de reflexión, transmisión y absorción, que no son excluyentes (Reinisch, 1996). La reflexión impide que cierta proporción de luz pueda penetrar en el tejido, mientras que la transmisión implica que la luz lo atraviese y, sin ser absorbida o dispersada, acceda al tejido adyacente. La reflexión y la transmisión no tienen efectos adversos sobre los tejidos biológicos siendo la absorción el principal causante de daño térmico. Además, el haz de luz que penetra en el tejido puede dispersarse en múltiples direcciones, debido a la interacción con tejidos que presentan una arquitectura heterogénea, lo que implica la irradiación de zonas más amplias. La absorción conlleva la conversión de la energía del haz láser en calor cuando los fotones de luz son captados por cromóforos presentes en los tejidos (Carroll y Humphreys, 2006). Los tres cromóforos más abundantes y mejor estudiados son la melanina, que absorbe radiación ultravioleta (UV), la hemoglobina, que absorbe la radiación visible, y el agua, que absorbe radiación infrarroja. Cada uno de estos cromóforos presenta su propio espectro y máximos de absorción (Allemann y Kaufman, 2011).

La energía NIR se clasifica en NIR-I (750-1000 nm) y NIR-II (1000-1350 nm). La absorción de la energía NIR por parte del agua aumenta logarítmicamente a medida que aumenta su longitud de onda. Así, las longitudes de onda superiores a 900 nm disminuyen notablemente su capacidad de penetración en los tejidos, que además experimentan un acusado calentamiento debido a la absorción de la energía por parte del agua (Salehpour y col., 2019). Dado que es absorbida de forma mínima por el agua, la energía comprendida en la bioventana NIR-I penetra a mayor profundidad y se caracteriza por su mayor seguridad (Dariva y col., 2019). Por ello, esta región del espectro se conoce como ventana del agua o ventana terapéutica y se caracteriza por presentar menor dispersión que la observada en las regiones del visible o UV (Sakudo, 2016). La luz NIR I es capaz de alcanzar profundidades de hasta 10 cm en pecho, 7 cm en músculo y 4 cm en cráneo o cerebro (Weissleder, 2001).

El calor que se genera tras incidir la energía lumínica en determinados materiales metálicos es un efecto bien conocido. Para los metales en bloque, este fenómeno es independiente tanto de la longitud de onda incidente como de la forma del material. La reducción de su tamaño a la escala submicrométrica resulta en modificaciones de sus propiedades termodinámicas, químicas, mecánicas, electrónicas, electromagnéticas o espectroscópicas. Como consecuencia, las nanopartículas (NP) metálicas experimentan aumentos de temperatura dependientes de la longitud de onda incidente (Abu-Salah y col., 2010; Jaque y col., 2014). El oro presenta propiedades atractivas como material en bloque, que se conservan en la escala nanométrica: es un material bioinerte, posee alta conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión y a la oxidación. En cuanto a su interacción con la luz, el oro nanométrico experimenta una fuerte absorción de luz con determinadas longitudes de onda. Dicha absorción está condicionada en gran medida por la morfología de la NP y la constante dieléctrica del medio (Cobley y col., 2011), pudiendo convertir la energía lumínica absorbida en calor que se disipa y aumenta la temperatura del entorno (Ahmad y col., 2012). Este fenómeno, denominado resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*), se basa en las oscilaciones resonantes de los electrones libres que se producen en presencia de luz con longitudes de onda específicas. Tras ser excitados, los electrones de diferentes niveles atómicos regresan al estado basal liberando energía térmica. La SPR típica para nanoesferas de oro se localiza aproximadamente a una longitud de onda de 520 nm, pero puede ser desplazada a la región NIR mediante la modificación del tamaño y forma de las NP (Norouzi y col., 2018). Entre las nanoestructuras de oro capaces de desplazar su SPR hacia la región NIR se incluyen las NP conocidas como *nanorods*, *nanoshells*, y *nanocages*. Estos tipos de NP de oro se obtienen a través de protocolos de síntesis relativamente simples, siendo posible generar partículas con propiedades uniformes en un amplio rango de tamaños. La facilidad de funcionalización de este tipo de nanomateriales ha posibilitado que su uso se haya explorado en múltiples aplicaciones bionanotecnológicas (Yeh y col., 2012). Las HGNP (del inglés, *hollow gold nanoparticles*) son NP de oro huecas. Presentan una cubierta de oro

delgada con el interior desprovisto de material. Se caracterizan por exhibir un máximo de absorción intenso en la región NIR, que viene determinado por la relación entre el diámetro y el espesor de la cubierta metálica y por la uniformidad de su tamaño (Schwartzberg y col., 2006). Las HGNP ofrecen varias ventajas sobre las NP macizas, como una mayor eficiencia de absorción de luz en la región NIR por unidad de masa, lo que redunda en una reducción de la cantidad y del material necesario para su síntesis y, por tanto, del coste (Preciado-Flores y col., 2011). Además, el espacio hueco que poseen permite introducir fármacos y otras moléculas en su interior (Kumar y col., 2005; You y col., 2012). Tras irradiación con láseres que emiten en la región NIR del espectro, las HGNP han demostrado ser agentes fototérmicos eficientes tanto *in vitro* (Cebrián y col., 2013; Liu y col., 2014; Martín-Saavedra y col., 2017) como *in vivo* (Martín-Saavedra y col., 2014; Park y col., 2015; Wang y col., 2015; Sanchez-Casanova y col., 2020).

Existe cierta controversia en cuanto a la biocompatibilidad de las NP de oro. Al igual que ocurre con otros tipos de materiales, las características fisicoquímicas específicas de las distintas nanoestructuras sintetizadas, así como la variedad de metodologías y modelos empleados para determinar su toxicidad, dificultan la comparación directa de resultados (You y col., 2014). El tamaño de las NP condiciona decisivamente su distribución por el organismo, siendo mayor su dispersión en el mismo cuanto más pequeña es la nanoestructura (De Jong y col., 2008). En general, las NP con tamaño superior a 8 nm no se excretan por la orina dado que no es posible su filtración glomerular (Longmire y col., 2008), siendo el sistema hepatobiliar la ruta primaria de excreción de las NP que no se eliminan por vía renal. En general, las NP circulantes pueden ser captadas por hepatocitos que las eliminan por vía biliar si son metabolizables, y por células de Kupffer, que son parte del sistema retículo endotelial y cuya capacidad de eliminación también depende de procesos intracelulares. Por tanto, aquellas NP no susceptibles de degradación permanecen en las células siendo retenidas en el organismo (Chen y col., 2009). You y colaboradores (2014) no detectaron toxicidad en ratones CD-1 a los que se administraron por vía intravenosa (I.V.) 10 dosis de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de HGNP pegiladas, distribuidas a lo largo de dos

semanas. La cuantificación del oro depositado en hígado, bazo y riñón a lo largo del tiempo indicó una eliminación gradual pero lenta de las NP, cuya desaparición total necesita periodos superiores al tiempo de observación de tres meses. Guo y colaboradores (2013) observaron que un mes después de la administración I.V. de 20 mg kg⁻¹ de HGNP pegiladas a ratones BALB/c, éstas aún se detectaban en la sangre mientras que tres meses después, el 70 % del oro inyectado permanecía en el hígado.

4. CONTROL DE LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA MEDIANTE HIPERTERMIA INDUCIDA POR NIR

La hipertermia se ha explorado como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer desde los años 70. Los tratamientos basados en hipertermia persiguen exponer el tejido tumoral a un calentamiento que lo destruya, fenómeno denominado “ablación térmica”. Temperaturas superiores a 46 °C ya desencadenan un daño celular irreversible, generando necrosis en un alto porcentaje de células tras tiempos de exposición tan cortos como 10 min. Temperaturas entre 46 y 52 °C reducen el tiempo de exposición necesario para provocar la muerte celular, pero provocan trombosis microvascular, isquemia e hipoxia, comprometiendo seriamente la viabilidad de los tejidos circundantes a la zona de exposición. Temperaturas superiores a 60 °C provocan muerte celular instantánea mediante una desnaturalización rápida de las proteínas y la desestabilización de membranas lipídicas. En el rango de temperatura comprendido entre los 41 y 45 °C, la hipertermia puede ser empleada para aumentar la susceptibilidad de células tumorales a otros tratamientos, fenómeno que se denomina “sensibilización térmica”. El aumento moderado de temperatura en los tejidos provoca cambios en la permeabilidad vascular, aumentando el flujo sanguíneo y potenciando la acción de agentes quimioterapéuticos (Hurwitz, 2010; Beik y col., 2016). Al deprimir la actividad metabólica de las células tumorales, el calor incrementa la oxigenación global del tejido tumoral, convirtiendo a la hipertermia en un potente radiosensibilizador (Griffin y col., 2010). Los resultados de varios ensayos clínicos muestran que, en comparación con pacientes que solo recibieron radioterapia o quimioterapia, el tratamiento

adyuvante con hipertermia incrementó la supervivencia general de pacientes afectados por diferentes tipos de tumores sólidos, como el cáncer de mama, el melanoma, el sarcoma y el cáncer cervical localmente avanzado (Hurwitz, 2010; Moros y col., 2010; Issels y col., 2010). Las microondas, los ultrasonidos, la radiofrecuencia y el láser NIR son tecnologías que se han explorado para generar hipertermia de forma no invasiva.

La luz emitida por los laser NIR, en virtud de su penetrabilidad y alta capacidad de focalización, está siendo activamente explorada en el desarrollo de diferentes aplicaciones biomédicas en combinación con agentes fototérmicos (Wang y col., 2015; Norouzi y col., 2018). Los materiales que absorben energía en el infrarrojo cercano son candidatos para ser empleados no sólo en diagnóstico, sino también en terapias fototérmicas y fotodinámicas, así como en sistemas de administración de medicamentos. Existe una gran cantidad de nanomateriales, incluyendo varios basados en oro, que han sido propuestos como agentes fototérmicos antitumorales (Cebrián y col., 2013; Liu y col., 2014; Park y col., 2015). Una de las principales limitaciones de esta aproximación terapéutica es la dificultad que experimenta la energía NIR para alcanzar tumores muy profundos (Li y col., 2015). Este problema ha sido eludido mediante el empleo de sondas capaces de conducir hasta zonas profundas fibras ópticas emisoras de energía NIR. Se trata de un procedimiento mínimamente invasivo denominado terapia láser intersticial, cuya efectividad ha sido validada en un ensayo clínico de ablación térmica de tumor de próstata (Stern y col., 2016).

En los últimos años se han desarrollado sistemas que conjugan diferentes fármacos a múltiples tipos de NP para prolongar su vida media y mejorar su biodistribución, además de posibilitar vías de administración alternativas. Se han propuesto sistemas de liberación de medicamentos basados en los efectos fototérmicos y fotodinámicos de nanomateriales sensibles a la luz NIR. Estos sistemas desencadenan una liberación controlada de fármacos (Dariva y col., 2019), persiguiendo liberar la mayor cantidad posible del agente terapéutico en el órgano o tejido diana y minimizando su acceso y acumulación

en localizaciones inespecíficas. Esta estrategia es especialmente importante cuando se precisa evitar los importantes efectos secundarios derivados de la administración sistémica de quimioterapia (Park, 2007). Además, los materiales que absorben luz NIR se han explorado en aplicaciones en las que se persigue generar un incremento de temperatura suficiente para estimular promotores de genes *HSP* con el fin de controlar la expresión de diferentes transgenes. Así, se han desarrollado nanotransductores como *nanohorns* de carbono (Miyako y col., 2012), nanopartículas plasmónicas de sulfuro de cobre (CuSNP) (Martín-Saavedra y col., 2018) o HGNP (Cebrián y col., 2013) que tras irradiación NIR son capaces de activar la expresión de transgenes controlados por el promotor *HSP70B* tanto *in vitro* como *in vivo* (Miyako y col., 2012; Cebrián y col., 2013; Martín-Saavedra y col., 2014; Martín-Saavedra y col., 2018).

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación indican que es posible estimular la expresión transgénica tras irradiar hidrogeles de fibrina implantados en ratones C3H/HeNRj con un láser NIR que emite a 808 nm. Dichos hidrogeles se conforman fácilmente *in situ* implantando subcutáneamente una mezcla que contiene fibrinógeno, trombina, nanopartículas fototermicas y células que incorporan el transgén fLuc bajo el control del sistema activable por calor y dependiente del ligando rapamicina (Martín-Saavedra y col., 2014; Martín-Saavedra y col., 2018). En estos experimentos, los ratones fueron tratados con rapamicina y, a continuación, la zona implantada fue irradiada durante 10-15 min con un láser NIR emitiendo en régimen continuo, empleando una potencia de 17 mW/mm². Este tratamiento incrementó la temperatura en la superficie corporal irradiada hasta valores de 44-45°C, lo que indica que la luz aplicada es capaz de atravesar la piel del animal e incidir sobre las nanopartículas que alberga el implante. Los ensayos de bioluminiscencia revelaron que es posible inducir a demanda la expresión del transgén exclusivamente en la zona de irradiación de la luz NIR en aquellos animales que habían sido tratados con el dimerizador. Además, observamos que la expresión transgénica disminuye al interrumpir la administración de rapamicina pero podía

ser reestimulada tras readministrar el ligando e irradiar con luz NIR (Martín-Saavedra y col., 2014).

De forma similar, se ha podido regular la producción del factor de crecimiento transgénico VEGF (Martín-Saavedra y col., 2014). Es importante destacar que las condiciones experimentales empleadas en este modelo experimental no causaron daño en la piel o el músculo que rodea el implante. La irradiación láser no estimuló la expresión transgénica en aquellos grupos control que fueron implantados con hidrogeles que carecían de nanopartículas fototérmicas, a pesar de que se detectó un incremento de la temperatura de la superficie corporal iluminada que en algunos experimentos alcanzó los 40°C. Esta observación confirma que los tejidos biológicos no son totalmente transparentes a la luz NIR, sino que cierta proporción de energía absorbida se disipa en forma de calor debido a la presencia de cromóforos, por ejemplo, oxihemoglobina, hemoglobina reducida o melanina, con capacidad de absorción a 808 nm (Jacque y col., 2013).

OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Generar hidrogeles de fibrina fototérmicos que incluyen nanopartículas plasmónicas de oro y células que secretan BMP-2 transgénica tras activación mediante irradiación NIR en presencia de los agentes dimerizadores rapamicina o rapálogo AP21967.
2. Evaluar *in vitro* el potencial bioactivo de la BMP-2 transgénica secretada por hidrogeles fototérmicos.
3. Evaluar la regeneración ósea inducida por la BMP-2 secretada por hidrogeles fototérmicos implantados en un defecto de tamaño de crítico generado en calvaria de ratón.
4. Generar nanopartículas plasmónicas de oro conjugadas a trombina y caracterizar el nanomaterial resultante.
5. Preparar y caracterizar hidrogeles de fibrina fototérmicos empleando nanopartículas plasmónicas de oro conjugadas a trombina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. NIR-NP

Las NIR-NP utilizadas en este trabajo han sido generadas y caracterizadas por el Grupo de Películas y Partículas Nanoporosas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA) en Zaragoza, España. Todos los productos químicos empleados para la síntesis de HGNP se adquirieron en Merck y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

1.1 Preparación y caracterización de HGNP

La síntesis de HGNP se llevó a cabo siguiendo protocolos descritos previamente (Schwartzberg y col., 2006; Preciado-Flores y col., 2011; Ortiz de Solórzano y col., 2016), con algunas modificaciones. En primer lugar, se dispusieron en un matraz de fondo redondo 0,8 mL de cloruro de cobalto hexahidratado 0,4 M, 3,2 mL de citrato de sodio tribásico dihidratado 0,1 M y 400 mL de agua Milli-Q. La solución se desgasificó mediante inyección de argón durante 45 min añadiéndose a continuación, bajo agitación empleando un agitador magnético, 4 mL de una solución de polivinilpirrolidona (55 kDa) al 1 % y 900 μ L de borohidruro de sodio 0,1 M. La solución viró de rosa pálido a marrón oscuro en pocos segundos, indicando la formación de NP de cobalto. Con el fin de completar la hidrólisis del borohidruro de sodio, la dispersión de NP se mantuvo bajo agitación magnética e inyección de argón durante otros 15 min. Finalmente, a 380 mL de la dispersión de NP se añadieron, bajo agitación magnética, 100 mL de ácido cloroáurico 0,38 mM, lo que dio lugar a la formación de cloruro de cobalto y a la reducción del Au^{3+} . La solución se mantuvo en agitación durante otros 30 min para permitir el desplazamiento galvánico del cobalto por oro. El cambio de color en la dispersión de marrón a verde indicó la formación de HGNP. Tras la síntesis, las HGNP se lavaron varias veces con agua desionizada, centrifugando cada vez a 13000 x g durante 10 min, se liofilizaron utilizando un liofilizador modelo LyoQuest (Telstar S.L.) y se almacenaron a -20 °C.

Para determinar el contenido en Au y Co de las HGNP se utilizó la técnica de espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES),

empleando un equipo 4100 MP-AES (Agilent Technologies Inc.). Las HGNP se filtraron a través de un filtro de 0,25 μm de poro y se suplementaron con 0,1 volúmenes de agua regia. La determinación se realizó a longitudes de onda de 268 y 243 nm con una posición de visualización de 0° y presión de nebulización de 120 kPa.

El espectro de absorción en la región del ultravioleta-visible-infrarrojo cercano (UV-VIS-NIR) de las HGNP en suspensión acuosa se determinó utilizando un espectrofotómetro modelo 8453 (Agilent Technologies Inc.). Una caracterización físico-química más exhaustiva de las HGNP utilizadas en el presente trabajo se puede encontrar en publicaciones previas de nuestro grupo de investigación (Cebrián y col., 2013; Escudero-Duch y col., 2019).

1.2 Preparación y caracterización de HGNP acopladas a trombina

Las HGNP acopladas a trombina (HGNPT) se sintetizaron a partir de suspensiones acuosas de HGNP a concentración de 1 mg mL⁻¹. En primer lugar, la superficie de las HGNP se funcionalizó empleando el agente de acoplamiento bifuncional COOH-PEG-SH (5 KDa). Para ello, se añadió gota a gota una solución acuosa conteniendo 1 mg mL⁻¹ de dicho agente a un mismo volumen de la suspensión de HGNP, y se dejó reaccionar durante 2 h. La dispersión resultante se lavó dos veces en agua desionizada a 4 °C y dos veces, a la misma temperatura, en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) 500 mM (pH 5,5), centrifugando cada vez a 13000 x g durante 10 min. A continuación, se ajustó la concentración de la dispersión a 2 mg mL⁻¹ con tampón MES y se añadió, gota a gota y bajo agitación, un mismo volumen de una solución conteniendo EDC N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y NHS (N-hidroxisuccinimida) a 2 y 4 mg mL⁻¹, respectivamente, en tampón MES. Tras dejar reaccionar durante 10 min a 4 °C, las NP se lavaron tres veces en agua desionizada a 4 °C, centrifugando cada vez a 13000 x g durante 10 min. A continuación, el pH de la dispersión acuosa resultante se ajustó a 8, utilizando NaOH 0,1 M. Finalmente, se añadió un exceso de poli-L-lisina (PLL), en proporción 2:1 en peso, a la dispersión de NP y se dejó reaccionar bajo agitación a 4 °C durante 4 h para dar lugar a la unión covalente de los grupos amino de

PLL y éster de NHS. Para eliminar el exceso de PLL que no reaccionó, se realizaron cuatro ciclos de lavado en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4), centrifugando cada vez a 13000 x g durante 10 min. Las NP resultantes, denominadas "HGNP-PEG-PLL", se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

Con el fin de conjugar trombina bovina a las HGNP-PEG-PLL, se disolvieron 20 unidades NIH (del inglés, *National Institute of Health*) del enzima en 1 mL de PBS. Se define una unidad NIH como la cantidad de trombina capaz de coagular en 15 s una muestra de 0,2 mL de plasma diluida al 50 % en PBS, a 37 °C (Biggs, 1976). La solución de trombina en PBS se utilizó para dispersar 0,03 mg de HGNP-PEG-PLL, obteniéndose HGNP conjugadas a trombina que se denominaron HGNPT. La trombina no conjugada se eliminó mediante dos ciclos de lavado en PBS y centrifugación a 13000 x g durante 10 min, a 4 °C. Los coloides resultantes se analizaron espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro UV-VIS-NIR V-670 (Jasco). El potencial zeta de las dispersiones de NP se determinó mediante análisis de dispersión dinámica de luz utilizando un analizador de tamaño de partícula 90Plus (Brookhaven Instruments Corp.). El contenido de Au y Co en las HGNPT se determinó mediante espectrometría de emisión atómica, tal y como se ha descrito anteriormente. La actividad enzimática de la trombina conjugada a las NP se cuantificó utilizando el sustrato BOC-Val-Pro-Arg-AFC (Merck). Se diluyeron 10 µL de una dispersión acuosa conteniendo 30 µg mL⁻¹ de HGNPT en 65 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, y a continuación se mezclaron con 30 µL de una solución conteniendo 0,5 mg mL⁻¹ del sustrato diluido en agua desionizada. Tras incubar a 37 °C durante 30 min, se cuantificó la fluorescencia emitida por el fluoróforo 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) liberado como consecuencia de la hidrólisis del sustrato por la trombina. Para ello, tras excitar la muestra a 400 nm, se cuantificó la emisión a 505 nm en un lector de placas multimodo Synergy4 (Biotek Instruments).

1.3 Microscopía electrónica de transmisión

El estudio morfológico de las diferentes NP utilizadas en este trabajo se realizó utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*). Para visualizar el recubrimiento orgánico de las HGNPT, las NP se trataron con una solución de ácido fosfotúngstico (Gomez y col., 2014). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Tecnai T20 (FEI Company) en modo de campo claro y operando a 200 keV.

2. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

La secuencia del ADN complementario del gen (RAT)*Bmp2* (NM_017178.1) se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) empleando como molde el plásmido pBluescript-SK-BMP-2rat (Koh y col., 2006) y los oligonucleótidos 5'-GAATTGGGTACCGGGTTTAACTCGAG-3' y 5'-CTGCAGGGATCCGGCACGAG-3'. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción PmeI y BamHI y se ligó al vector pGene/V5-His A (Invitrogen) previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pGeneRatBMP. A continuación, en este plásmido se introdujeron dos sitios de restricción para el enzima ClaI, haciendo uso del kit de mutagénesis dirigida Quikchange (Agilent) con los siguientes oligonucleótidos y sus complementarios:

5'-GGATCGGGAGATCGTACCTATCGATTACGCGGGTCGAAGCGG-3' y 5'-GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTATCGATGCGGAAAGAACCAG-3'. Ambos sitios de restricción ClaI flanquearon un fragmento que contiene el promotor del gen *GAL4*, la secuencia codificante del gen *Bmp2* y las secuencias adyacentes de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El plásmido resultante, denominado pGeneRatBMP-ClaIx2, sirvió como molde para amplificación mediante PCR utilizándose los oligonucleótidos 5'-GAGATCGTACCTAACGCGTACGC-3' y 5'-CTGGTTCTTTCCGCATCGATAGCC-3'. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción MluI y ClaI y se ligó al fragmento de mayor tamaño que se

obtuvo tras digerir el plásmido pLH-Z₁₂I-PL (ARIAD Gene Therapeutics Inc) con MluI y ClaI, obteniéndose el plásmido pLH-GAL4-ratBMP-2-BGHpA. A continuación, se introdujo una secuencia de reconocimiento para el enzima BamH en el sitio de multiclonaje del plásmido pLH-Z₁₂I-PL, utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange y el oligonucleótido 5'-TTGCCCTGCAGCGGGGATCCCACTAGTCGAGATC-3' y su complementario. El plásmido resultante se digirió con BamHI y ClaI. El fragmento de mayor tamaño se ligó a un fragmento que contiene la secuencia codificante del gen *Bmp2* y la secuencia de poliadenilación adyacente, obtenido tras digerir el plásmido pLH-GAL4-ratBMP-2-BGHpA con BamHI y ClaI. El plásmido resultante se denominó pLH-Z₁₂I-PL-ratBMP2.

Las enzimas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs mientras que los oligonucleótidos procedieron de Sigma-Aldrich. Todas las etapas de subclonaje y mutagénesis se monitorizaron mediante análisis de restricción y secuenciación de nucleótidos.

3. LINEAS CELULARES

En este trabajo se han utilizado las células C3H/10T1/2, clon 8 (ATCC CCL-226) y sus líneas clonales C3H/10T1/2-BMP-2^{High} y C3H/10T1/2-fLuc que albergan de forma estable un circuito génico, activable por calor y dependiente de un dimerizador, para controlar la expresión de BMP-2 y fLuc, respectivamente. La línea C3H/10T1/2-BMP-2^{High} se generó en el curso de este trabajo, mientras que a su inicio nuestro grupo de investigación ya disponía de la línea C3H/10T1/2-fLuc (Martín-Saavedra y col., 2013).

Las células multipotentes embrionarias de ratón C3H/10T1/2 se cultivaron en el medio de crecimiento comercial EMEM (del inglés, *Eagle's minimum essential medium*; Lonza) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Hyclone) previamente tratado a 56 °C durante 30 min, 1 % de L-glutamina (Lonza), 100 U mL⁻¹ de penicilina y 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomicina (Lonza). Este medio se denominó EMEM-FBS.

Para generar la línea clonal C3H/10T1/2-BMP-2^{High}, se empleó un clon derivado de células C3H/10T1/2 que integra de forma estable en su genoma las secuencias codificantes de los dos módulos de un transactivador quimérico dependiente de un dimerizador (Martín-Saavedra y col., 2013). Dichos módulos se expresan bajo el control de un promotor híbrido que contiene secuencias del promotor del pseudogen humano *HSP70B* (*HSPA7*) y secuencias de un promotor que responde al transactivador activo. Dicho clon se transfectó con el plásmido pLH-Z₁₂I-PL-ratBMP-2, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Con el fin de seleccionar transfectantes estables, los cultivos se suplementaron con 1200 µg mL⁻¹ de G418 y 600 µg mL⁻¹ de higromicina B (ambos de Invivogen). Se aislaron clones celulares cuya inducibilidad se caracterizó mediante tratamiento térmico en presencia de dimerizador. Como dimerizadores se emplearon la rapamicina (Invivogen) que se disolvió en N, N-dimethylacetamide (DMA) a una concentración de 5 mg mL⁻¹ y el rapálogo AP21967 (Clontech) que se disolvió a 0,5 mM en etanol absoluto. Se sembraron 10⁵ células en 1 mL en pocillos de placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 24 h. Las células se trataron con rapamicina 10 nM o con AP21967 150 nM y tras 75 min, los cultivos se sumergieron durante 30 min en un baño de agua termostatzado a 44 °C. Una vez finalizado el tratamiento térmico, las células se incubaron durante 24 h, recogiendo a continuación el medio de cultivo. Se identificó una línea celular altamente inducible que, tras el tratamiento térmico en presencia de dimerizador, secretaba niveles elevados de BMP-2, determinados mediante inmunoensayo tal y como se indica en el apartado 13. Dicha línea se denominó C3H/10T1/2-BMP2^{High}.

Las líneas clonales C3H/10T1/2-BMP-2^{High} y C3H/10T1/2-fLuc se cultivaron en el medio de crecimiento comercial DMEM (del inglés, *dulbecco's modified eagle medium*; Lonza) suplementado con 10 % de FBS, 100 U mL⁻¹ de penicilina y 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomina. Este medio se denominó DMEM-FBS. Además, el medio incluyó 1200 µg mL⁻¹ de G418 y 600 µg mL⁻¹ de higromicina B como antibióticos de selección.

Todas las líneas celulares empleadas en este trabajo se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa (37 °C/5 % CO₂).

4. HIDROGELES DE FIBRINA

4.1 Preparación de hidrogeles de fibrina

Con el fin de generar hidrogeles de fibrina conteniendo HGNP, el fibrinógeno bovino (Merck) se disolvió a una concentración de 40 mg mL⁻¹ en DMEM, a 4 °C. Para preparar hidrogeles de fibrina conteniendo HGNPT, el fibrinógeno se disolvió a 20 mg mL⁻¹ en idénticas condiciones. Las HGNP y HGNPT liofilizadas se resuspendieron en agua desionizada estéril a concentración de 1 mg mL⁻¹, sonicándose a continuación con el fin de reducir su agregación durante 20-30 min en un baño de ultrasonidos (Branson Ultrasonidos S.A.E.) que opera a 40 kHz y 80 W de potencia de salida. A un volumen de fibrinógeno se le añadieron 0,8 volúmenes de DMEM conteniendo las concentraciones de HGNP y HGNPT necesarios para alcanzar las concentraciones de NP indicadas en cada experimento, así como células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} o C3H/10T1/2-fLuc para alcanzar concentraciones finales en el hidrogel que oscilaron entre 2,5 y 4 x 10⁶ células mL⁻¹. Finalmente, para catalizar la polimerización de los hidrogeles que contenían HGNP, se agregaron 0,2 volúmenes de una solución enfriada en hielo de DMEM conteniendo 20 unidades NIH mL⁻¹ de trombina bovina. Tras homogeneizar mediante pipeteo, la suspensión se distribuyó a razón de 0,25 mL por pocillo en placas de 48 pocillos que, con el fin de evitar que la fibrina se adhiriese al plástico de cultivo, habían sido pretratados con 0,25 mL de FBS. Las suspensiones se dejaron polimerizar a 37 °C/5 % CO₂ durante 30 min, añadiéndose a continuación 0,25 mL de DMEM suplementado con 20 % de FBS. Tras incubar el hidrogel a 37° C/5 % CO₂ durante 4 h, el medio de cultivo se reemplazó por 1 mL de medio DMEM-FBS. En algunos experimentos y utilizando el mismo procedimiento, se prepararon hidrogeles que no contenían NP o células.

En aquellos experimentos en los que se cuantificó la degradación de la matriz de fibrina, durante la preparación del hidrogel la suspensión de

fibrinógeno se suplementó con 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fibrinógeno humano conjugado a Alexa Fluor 546 (Fbg-AF546, Invitrogen). La liberación al medio de cultivo de productos de degradación conteniendo Fbg-AF546 se determinó mediante excitación a 558 nm y cuantificación de la fluorescencia emitida a 573 nm, utilizando un lector de placas multimodo Synergy4.

Los hidrogeles que albergan HGNP y células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} o C3H/10T1/2-fLuc se denominaron NIR-BMP-2-HG y NIR-fLuc-HG, respectivamente.

4.2. Caracterización de hidrogeles de fibrina

La morfología interna de los hidrogeles se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscopy*). Los hidrogeles se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se seccionaron transversalmente con un bisturí. Las muestras se liofilizaron utilizando un liofilizador modelo Lyoquest (Telstar) y se recubrieron con una fina capa de platino previamente a su visualización con un microscopio Inspect F50 (FEI Company), empleando rangos de energía comprendidos entre 10 y 15 keV. Los diámetros medios de los poros de los hidrogeles se cuantificaron en, al menos, 200 poros correspondientes a 4 hidrogeles de cada condición experimental, utilizando el programa *Image J*.

El comportamiento viscoelástico de los hidrogeles se estudió empleando un reómetro de esfuerzo y deformación controlada (TA ARG2, TA Instruments), utilizando una geometría de platos paralelos de 20 mm de diámetro. Se realizaron medidas de cizallamiento oscilatorio determinándose los valores del módulo de almacenamiento (G') y del módulo de pérdidas (G''). La zona de comportamiento viscoelástico lineal se determinó tras realizar un barrido de temperatura entre 4 y 37 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C min^{-1} , una frecuencia oscilatoria de 0,5 Hz y una tensión oscilatoria del 0,5 %.

El perfil de degradación de los hidrogeles, así como la capacidad de migración de las células incluidas en los mismos se determinó mediante ensayos *in vitro*. Se prepararon hidrogeles que se sometieron a irradiación NIR al cabo de

1 y 6 días tras ser polimerizados, incubándose durante un periodo total de 45 días. Periódicamente se tomaron fotografías de los hidrogeles y, previo lavado con PBS, se tiñeron los pocillos en los que se habían incubado los hidrogeles con una solución de cristal violeta (George T. Gurr Ltd.) al 0,5 % disuelto en etanol al 20 %, durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar extensivamente los pocillos con agua destilada, las células teñidas se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BX41 (Olympus). Los hidrogeles se dispusieron en otro pocillo de cultivo, se suplementaron con medio de cultivo y se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ hasta la siguiente toma de imagen y tinción celular.

5. ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA

La actividad metabólica de las poblaciones celulares incluidas en los hidrogeles se analizó utilizando el reactivo comercial alamarBlue (Biosource). Este reactivo incorpora el indicador de óxido-reducción resazurina que a consecuencia de la actividad metabólica se reduce al compuesto fluorescente resorufina. Tras lavar con PBS, los hidrogeles se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ en el medio de cultivo específico suplementado con alamarBlue al 10 %, durante 3-4 h. Se recolectó el medio de cultivo y tras excitar a 530 nm, se cuantificó la señal de fluorescencia emitida a 590 nm usando un espectrofluorímetro Synergy4.

6. MICROSCOPIA CONFOCAL

La distribución de las poblaciones celulares contenidas en los hidrogeles se estudió mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM, del inglés *confocal laser scanning microscopy*). Los hidrogeles se seccionaron transversalmente usando un bisturí y se lavaron con PBS. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 40 min y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % en PBS durante 15 min. Para visualizar los filamentos de actina, los hidrogeles se incubaron con 0,3 µg mL⁻¹ de faloidina-TRITC (Merck) en PBS durante 40 min. Tras dos lavados con PBS, y con el fin de

observar el núcleo celular, las muestras se incubaron con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Merck) en PBS durante 10 min. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*) y en oscuridad. Tras lavar con PBS, se tomaron imágenes de las muestras utilizando un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 AOBS (Leica Microsystems). Para visualizar los filamentos de actina, las muestras se excitaron con la línea de láser de 532 nm y la señal de fluorescencia se recogió en el rango de 560 a 621 nm. Para observar el núcleo celular las muestras se excitaron a 405 nm y se recogió la señal en el rango de 428 a 506 nm. Se adquirieron imágenes de 3872×1456 píxeles, correspondientes a áreas de $10,23 \times 3,38$ mm, distribuidas en 10 secciones del eje Z y cubriendo una profundidad de 500 μm , con un objetivo seco 10 X y una apertura numérica de 0,5. Adicionalmente, se adquirieron imágenes magnificadas de $607,2 \times 607,2 \mu\text{m}$ distribuidas en 100 secciones a lo largo del eje Z, cubriendo una profundidad de 250 μm , con un objetivo seco de 10 X y apertura numérica de 0,3. Las imágenes se analizaron empleando el programa informático Leica LAS AF (versión 2. 6. 0. 7266).

Las células viables y no viables incluidas en los hidrogeles se discriminaron mediante tinción con éster acetoximetílico de calceína (calceína-AM), que tiñe células vivas, que presentan actividad esterasa, y con el homodímero de etidio-1 (EthD-1), agente impermeable a membranas celulares íntegras. Los hidrogeles se seccionaron como se ha indicado anteriormente y tras lavar con PBS, se incubaron durante 2 h a RT en medio DMEM-FBS conteniendo calceína-AM 2 μM y EthD-1 4 μM (ambos de Invitrogen) para la tinción de células viables y dañadas, respectivamente. Las muestras se lavaron suavemente con PBS antes de ser examinadas utilizando el microscopio confocal espectral Leica TCS SPE AOBS. Para visualizar las células teñidas con calceína-AM y EthD-1, las muestras se excitaron con las líneas láser 488 y 532 nm, recogiendo la emisión a 517 y 617 nm, respectivamente. Se obtuvieron imágenes de $4,7 \text{ mm}^2$ del área de interés realizándose secciones de 2 μm a lo largo del eje Z que se analizaron con el programa informático indicado anteriormente. La cuantificación de las células vivas, teñidas con calceína-AM,

se realizó empleando el programa informático de análisis Image J/Fiji (Schindelin y col., 2012).

7. IMPLANTACIÓN DE HIDROGELES

Todos los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Órgano Encargado del Bienestar Animal del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz) en cumplimiento de la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE para experimentación animal (PROEX 141/17). Con el fin de evaluar la severidad de los procedimientos, como indicadores de bienestar animal se utilizaron parámetros físicos como la presencia de lesiones visibles, así como la monitorización de los cambios de comportamiento y de peso de los animales durante los experimentos.

Se utilizaron ratones de la cepa C3H/HeNRj (Janvier-Labs) de 4-5 semanas de edad en los experimentos de implantación subcutánea en la región dorsal y de 7 semanas en los experimentos de implantación en calvaria. Con el fin de preparar la región de implantación, se eliminó el pelo mediante afeitado con rasuradora mecánica y tratamiento con crema depilatoria. Los animales se anestesiaron con isoflurano (Baxter) al 5 % para la inducción y al 2 % para el mantenimiento.

Con el objetivo de retrasar la degradación de la fibrina una vez implantada, las mezclas de los componentes con los que se prepararon los hidrogeles se suplementaron con $0,15 \text{ U mL}^{-1}$ de aprotinina (Merck).

Para los experimentos de implantación subcutánea, se mezclaron los componentes de hidrogeles de fibrina conteniendo HGNPT o HGNP, o careciendo de NP, como se describe en el apartado 4.1 y se incorporaron 10^6 de células C3H/10T1/2-fLuc en un volumen final de 0,5 mL. Este volumen se inyectó en el espacio subcutáneo de la región dorsal posterior utilizando una aguja de incisión 25G.

Con el fin de implantar hidrogeles en defectos óseos de tamaño crítico practicados en calvaria, se realizó una incisión coronal de 3 cm en el cuero cabelludo a nivel occipital para exponer la bóveda craneal. Se creó un defecto de

tamaño crítico de 4 mm de diámetro utilizando un taladro dental de carburo de tungsteno (calibre 012; Hager & Meisinger) conectado a un micromotor de alto par (Mestra) bajo irrigación continua con solución salina normal (Fresenius). La incisión coronal se cerró con una sutura reabsorbible Vicryl recubierta 6/0 (Ethicon). A continuación, se mezclaron los componentes de los hidrogeles de fibrina conteniendo o no HGNP, como se describe en el apartado 4.1. Los hidrogeles incorporaron 10^6 de células C3H/10T1/2- κ Luc o C3H/10T1/2-BMP-2^{High} en un volumen final de 0,25 mL. Inmediatamente después de preparar las mezclas, este volumen se inyectó en el área del defecto utilizando una aguja de incisión de 25G. En algunos experimentos se ensayaron asimismo hidrogeles que carecieron de células.

Una vez inyectados los hidrogeles, los animales se mantuvieron inmóviles bajo una lámpara incandescente durante 5 min para facilitar la polimerización *in situ* del implante, ubicándose a continuación en una jaula de recuperación.

8. IRRADIACIÓN NIR

Las irradiaciones con láser NIR se llevaron a cabo utilizando un sistema compuesto por un láser diodo que emite a una longitud de onda de 808 nm, acoplado a una fibra óptica de 400 μ m de diámetro (Optilas MDL-III-808-2W, New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd.) conectado a un colimador de foco fijo ($f = 11,07$ mm, apertura numérica de 0,26; Thorlabs) y a un sensor fotodiodo de silicio modelo PD300-3W que se utiliza en combinación con un potenciómetro modelo NOVA II (ambos de Ophir Laser Measurement Group) para cuantificar la energía depositada desde el colimador por unidad de superficie. La fibra óptica se encuentra acoplada a un sistema de microposicionamiento que durante los ensayos *in vitro* se coloca en el interior de una cámara termostática (modelo Stuart SI60D, Fisher Scientific Afora) con el fin de mantener la temperatura ambiental a 37 °C. Para determinar las dimensiones del punto de irradiación láser a una distancia conocida desde la superficie del colimador se utilizó una tarjeta fotosensible VRC4 (Thorlabs).

En los ensayos *in vitro*, las matrices poliméricas se colocaron en pocillos de placas de 48 pocillos, sumergidas en 0,5 mL de medio de crecimiento conteniendo o no dimerizador a las concentraciones indicadas en el apartado 3. Después de 75 min de incubación a 37 °C/5 % de CO₂ con el dimerizador, los hidrogeles se irradiaron con el láser NIR durante 10 min a 44 mW mm⁻² en el interior de la cámara termostática. Como controles se emplearon hidrogeles que no contenían NP, o que no se irradiaron. Un día después de la irradiación, se recogieron los medios de cultivo, que se utilizaron para cuantificar mediante inmunoensayo los niveles de proteína secretada, como se indica en el apartado 13. Los cronogramas de estos experimentos se muestran en las Figs. 7A, 10A, 11A, 12A, 14A.

En los experimentos en que los hidrogeles se implantaron en el espacio subcutáneo, las irradiaciones se realizaron 1 día tras la implantación. En aquellos experimentos en que los hidrogeles se implantaron en un defecto crítico practicado en calvaria, los animales fueron irradiados 1 y 8 días tras la implantación. En todos los casos, antes de la irradiación se administró una dosis de 1 mg kg⁻¹ de rapamicina en un volumen de 0,1 mL, mediante inyección intraperitoneal empleando una aguja de incisión de 27G. Inmediatamente antes de su administración, la rapamicina disuelta a concentración de 5 mg mL⁻¹ en DMA¹ se diluyó en una mezcla de DMA al 50 %, polioxietilenglicol (peso molecular medio de 400 Da) al 45 % y monooleato de sorbitán polioxietilenado al 5 % (todos de Merck). Al cabo de 75 min tras la administración de rapamicina, los ojos de los ratones se cubrieron con papel de aluminio para evitar el daño retiniano y la zona implantada se sometió a irradiación NIR durante 10 min utilizando una potencia de entre 11 y 17 mW mm⁻².

Los cambios de temperatura en la superficie de los hidrogeles o de las áreas implantadas, en el caso de los ensayos *in vivo*, se monitorizaron mediante termografía infrarroja (IR) usando una cámara de imagen térmica Testo 875-2i (Testo, Inc.).

9. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

La actividad luciferasa se cuantificó mediante ensayos de bioluminiscencia. En los ensayos *in vitro*, se añadió D-luciferina (Promega Biotech Ibérica) a concentración de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ al medio de cultivo de los intermediarios tisulares, incubando a continuación durante 15 min a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Los ensayos de bioluminiscencia *in vivo* se realizaron anestesiando a los animales como se ha indicado en el apartado 7. A continuación, se inyectaron 50 μL de una solución de D-luciferina a concentración de 40mg mL^{-1} en PBS en la proximidad de la región de implantación. Tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, la señal de luminiscencia se adquirió con un equipo de imagen óptica IVIS-Lumina II (PerkinElmer). Los datos se analizaron utilizando el programa Living Image 4.0 (PerkinElmer).

10. ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

El ARN total de las células incluidas en los hidrogeles se purificó utilizando el kit “Animal Tissue RNA Purification” (Norgen Biotek Corporation) y se procesó utilizando el kit GeneChip WT PLUS Reagent, con el fin de generar dianas biotiniladas de ADN complementario que se hibridaron con la matriz GeneChip® Mouse Clariom S (todos de Applied Biosystems). Para escanear la matriz se utilizó un escáner GeneChip 3000 7G (Applied Biosystems), cuantificándose los niveles de transcripción de aproximadamente 22100 genes. Los datos se normalizaron y los niveles de expresión de los genes se analizaron utilizando el algoritmo Robust Multi-array Average del programa informático Transcriptome Analysis Console (Applied Biosystems). Para cada condición experimental, se procesaron y analizaron tres réplicas de ARN correspondientes a tres experimentos independientes. Los cambios en la expresión génica entre las diferentes condiciones experimentales se calcularon como la razón de las medias de las señales de expresión obtenidas para cada gen. Los genes que experimentaron cambios significativos de sus niveles de expresión mayores o iguales a 1,5 veces se consideraron para los análisis posteriores. Los análisis ontológicos se realizaron usando la base de datos DAVID, (del inglés, *Database*

for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Huang y col., 2009).

Las conclusiones extraídas para un número representativo de genes de los experimentos con microarrays fueron corroboradas mediante ensayos de retrotranscripción acoplados a ensayos de PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative PCR*). Para ello, se preparó ADN complementario a partir del ARN total utilizando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies). Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo utilizando los ensayos de expresión génica TaqMan (Life Technologies) indicados en la Tabla 7, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un equipo 7900HT (Applied Biosystems). Para el análisis de los datos se utilizó el programa informático Sequence Detection System 2. 4 (Applied Biosystems), con el que se determinaron los valores de ciclo umbral (CT, del inglés *cycle threshold*). Los cambios relativos en la expresión de genes se determinaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Como normalizadores se utilizaron los genes de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*Gapdh*, ensayo Mm99999915_g1), de beta-glucuronidasa (*Gusb*, ensayo Mm01197698_m1) y de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*, ensayo Mm03024075_m1).

11. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA

Se dispusieron 10 μL de una suspensión conteniendo 10^5 células C3H/10T1/2 en medio EMEM-FBS en el centro del pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos. Las células se incubaron a 37° C/5 % CO_2 durante 2 h y a continuación se agregó lentamente 1 mL de medio EMEM-FBS. Tras 24 h de incubación a 37° C/5 % CO_2 , se eliminó el medio y los cultivos en micromasa se trataron con proteína recombinante humana BMP-2 (rBMP-2; R&D) a concentraciones que oscilaron entre 1 y 100 ng mL^{-1} en presencia o no de dimerizador. La rapamicina se utilizó a concentración 10 nM mientras que el rapálogo AP21967 se ensayó a 10 y 100 nM. Tras 5 días de incubación, el medio se reemplazó por medio EMEM-FBS fresco conteniendo las correspondientes concentraciones de rBMP-2 y/o dimerizador, prolongándose la incubación a 37 °C/5 % CO_2 durante 5 días

más. Como controles se dispusieron cultivos en micromasa que no se trataron con rBMP-2 ni con dimerizador.

En algunos experimentos, los cultivos en micromasa se cocultivaron con células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} contenidas en hidrogeles fototérmicos, empleando un inserto poroso que permite el intercambio de factores solubles sin que exista contacto físico entre ambos tipos celulares (Corning). El inserto se compone de una membrana de poliéster con un diámetro de 12 mm y 10 µm de espesor, y sus poros presentan un diámetro de 0,4 µm. El hidrogel se dispuso sobre un inserto que se situó sobre un pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos en la que 24 h antes se habían sembrado células C3H/10T1/2 en micromasa, tal como se ha detallado anteriormente. Tras incubar los cocultivos a 37 °C/5 % CO₂ durante 24 h en un volumen de 1 mL, el hidrogel se extrajo del sistema con el fin de someterlo a irradiación NIR, en presencia o ausencia de AP21967 100 nM, como se ha indicado en el apartado 8. Inmediatamente después de finalizar la irradiación, los hidrogeles se dispusieron de nuevo en el inserto y se cocultivaron con las células en micromasa en presencia o ausencia de AP21967 100 nM, en un volumen de 1 mL de medio de cultivo EMEM-FBS. Transcurridos 5 días, los hidrogeles se extrajeron de nuevo del sistema de cocultivo, se irradiaron en presencia o ausencia de AP21967 100 nM y se dispusieron en el inserto, cultivándose con las células en micromasa durante 5 días adicionales en presencia o ausencia de AP21967 100 nM.

Al finalizar los periodos de incubación, los cultivos en micromasa se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min y a continuación se incubaron durante 18 h a 37 °C con azul alcian (Merck) disuelto al 0,05 % en una solución conteniendo 4 partes de etanol al 75 % y 1 parte de HCl 0,1 M. Tras lavar exhaustivamente con HCl 0,1 M, los cultivos se escanearon usando un escáner de documentos (ScanJet 3400C, Hewlett Packard) y se visualizaron usando un microscopio Olympus BX41.

Los cronogramas de estos experimentos se muestran en las Figs. 13A y 14A.

12. ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES

La formación de estructuras tubulares se estudió cultivando explantes aórticos en Matrigel (Corning), una preparación de membrana basal reconstituida de proteínas de membrana y proteínas extracelulares extraídas del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón que estimula la adhesión y diferenciación en estructuras tubulares de las células endoteliales. Se compone de laminina al 60 %, colágeno IV al 30 % y entactina al 8 %, además de factores de crecimiento como el *TGF- β* , factor de crecimiento epidérmico (*EGF*, del inglés *epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*IGF-1*, del inglés *insulin-like growth factor-1*), entre otros.

Las aortas torácicas se extrajeron de ratones macho de la cepa C3H/HeNRj, de entre 6 a 10 semanas, que se sacrificaron mediante exposición a una mezcla de dióxido de carbono al 70 % en oxígeno. Tras su extracción, las aortas se dispusieron en una placa Petri que contenía PBS frío. El tejido fibroadiposo periaórtico se separó cuidadosamente utilizando pinzas de punta extrafina y tijeras curvas de microdisección, prestando especial atención a no dañar la pared aórtica. Haciendo uso de una regla y de una lupa se seccionaron 12-15 anillos por aorta, cada uno con una longitud de 1 mm de acuerdo a la metodología descrita previamente por Bellacen y col., 2009 y Primo y col., 2010. A continuación, se dispuso una gota conteniendo 15 μ L de Matrigel en un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Una vez transcurridos 5 min, se depositó el anillo aórtico sobre la gota de Matrigel. Al cabo de 10 min se añadió otra gota de 15 μ L de Matrigel sobre el anillo, que quedó embebido en la matriz. Las muestras se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ durante 10 min y por último se les añadió 0,3 mL de medio de cultivo. Los anillos aórticos se cultivaron durante 7 días, remplazándose el medio de cultivo cada 2-3 días.

La formación de nuevos vasos a partir de cada anillo aórtico se visualizó mediante microscopía óptica, usando un microscopio óptico Olympus BX41, desde el día en que se embebieron en Matrigel, así como tras 3, 5 y 7 días de incubación a 37 °C/5 % CO₂. La cuantificación del área de cada anillo aórtico se realizó utilizando el programa de imagen Image J/Fiji. En cada experimento, se cuantificaron las áreas de 5 anillos aórticos por condición experimental,

analizándose datos obtenidos en tres experimentos independientes de acuerdo al protocolo descrito por Berger y col., 2004.

13. ENSAYOS TIPO ELISA

La concentración de BMP-2 se ha determinado usando kits de ELISA que emplean anticuerpos específicos, siguiendo las instrucciones del proveedor (R&D Systems).

En los experimentos *in vitro*, se cuantificó la concentración de BMP-2 en los medios de cultivo. Para ello, se recolectó el medio y se suplementó con bacitracina a 50 mg mL⁻¹, aprotinina a 2 mg mL⁻¹, fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 17,42 mg mL⁻¹ y pepstatina a 1 mg mL⁻¹ (todos de Sigma-Aldrich). Por otro lado, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 75 µL de un tampón de lisis (Passive Lysis Buffer, Promega) a 4 °C durante 30 min, con fuerte agitación. Los extractos se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso. La concentración de BMP-2 secretada al medio de cultivo se normalizó de acuerdo a la cantidad total de proteínas en los extractos, que se cuantificaron mediante el método de Bradford utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino (Merck) como estándar.

Para cuantificar la producción de BMP-2 en los implantes, los ratones se sacrificaron y los implantes se extirparon y pesaron en una báscula de precisión. Los implantes se homogeneizaron en un tampón de lisis que contenía Tris-Cl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,1 %, SDS al 0,1 %, NaCl 140 mM y PMSF 1 mM, haciendo uso de un homogeneizador (Ultra-turrax T8, IKA). Por último, los extractos se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min a 4 °C, cuantificándose el contenido de BMP-2 en el sobrenadante. La cantidad de proteína secretada se normalizó de acuerdo al peso de cada implante.

En todos los casos, las determinaciones espectrofotométricas se realizaron empleando un lector de placas multimodo Synergy4, excitando las muestras a 450 nm, y cuantificando su emisión a 540 nm.

14. HISTOLOGÍA

Las muestras de hidrogeles se fijaron en formalina (VWR Chemicals) durante 24 h para posteriormente ser deshidratadas en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100 %) y tratadas con xileno en un procesador de tejidos Leica TP1020 (Leica Biosystems). Las muestras se embebieron en bloques de parafina, haciendo uso de una estación de inclusión Leica EG1160 (Leica Biosystems). Dichos bloques se cortaron en secciones de 5 μ m empleando un micrótopo rotatorio Leica RM2255 (Leica Biosystems). Se eliminó la parafina de las secciones mediante incubación en una estufa a 60 °C durante 30 min, se trataron con xilol y se rehidrataron en soluciones de concentración decreciente de etanol (100, 96, 80 y 70 %). Con el fin de desenmascarar los epítomos, las secciones se incubaron en tampón de citrato 0,01 M (pH 6,0) durante 20 min a 95 °C, en un equipo PTLINK (Dako). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió mediante incubación de las secciones en metanol conteniendo peróxido de hidrógeno al 2,88 % durante 10 min a RT. Tras lavar con PBS, las muestras se incubaron con una solución de bloqueo conteniendo albúmina de suero bovino al 1,5 %, suero caprino (Bio-Rad) al 10 % y Tween 20 (Merck) al 0,05 %, a RT durante 1 h. Con el fin de identificar células que sobreexpresan BMP-2, las muestras se incubaron durante 18 h a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BMP-2 (Ab6285, Abcam) diluido 250 veces en la solución de bloqueo. Después de lavar con PBS, las muestras se incubaron durante 60 min a RT con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (Millipore), generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 200 veces en solución de bloqueo. Finalmente, y tras lavar con PBS, las muestras se tiñeron con 3,3'-diaminobenzidina (Histología CINTec) durante 7 min a RT.

Para analizar el grado de regeneración tisular tras la activación de hidrogeles implantados en defectos óseos, las cabezas de los animales se extirparon quirúrgicamente y se fijaron con formalina durante 4 días. A continuación, se expusieron a una solución descalcificadora que contenía EDTA (Osteodec, Bio-Optica) durante 3 días a 4 °C, con cambios diarios de la solución. Las cabezas se sumergieron tres veces en PBS, durante 20 min cada vez, y se eliminó el hocico y la mandíbula inferior utilizando un bisturí. A continuación, las muestras se deshidrataron en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, se trataron con xileno, se embebieron en bloques de parafina y se cortaron en secciones de 7 μm tal y como se ha detallado anteriormente. Tras desparafinar y rehidratar las secciones, éstas se sometieron a tinción empleando tricómico de Masson (Merck) siguiendo las instrucciones del proveedor.

En aquellos experimentos en que los hidrogeles se implantaron en el espacio subcutáneo, éstos se extrajeron quirúrgicamente junto con los tejidos circundantes y se fijaron en formalina. A continuación, las muestras se deshidrataron en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, se trataron con xilol y finalmente con xileno, embebiéndose posteriormente en parafina, tal y como se describe anteriormente. Se obtuvieron secciones de 5 μm y tras desparafinar y rehidratar las muestras, éstas se tiñeron empleando tricómico de Masson.

Las secciones histológicas se examinaron en un microscopio óptico Olympus BX41. En el caso de la implantación en calota se analizaron 6 secciones histológicas de regiones independientes del área de implantación ($n=5$). El grado de regeneración del defecto óseo se determinó mediante histomorfometría, utilizando un método de puntuación para la evaluación cualitativa del hueso recién formado (Han y col., 2018). El área del defecto, de un borde a otro de la osteotomía, fue segmentada en un rectángulo que contenía 135 cuadrados, con una longitud de 27 cuadrados y un ancho de 5 cuadrados, cada uno con una longitud lateral de unas 125 μm . Para evaluar el grado de regeneración del hueso en cada cuadrado se aplicó un sistema de puntuación de 0 a 4. La puntuación 0 correspondió a cuadrados sin tejido, la puntuación 1 a cuadrados conteniendo únicamente tejido fibroso, las puntuaciones 2 y 3

correspondieron a cuadrados conteniendo tejido fibroso y un contenido de tejido mineralizado inferior o superior, respectivamente, al 50 %, y la puntuación 4 correspondió a cuadrados conteniendo exclusivamente tejido mineralizado. Para cada defecto analizado se determinó el valor promedio de las puntuaciones correspondientes a los 135 cuadros.

Se utilizó el programa informático (Image J/Fiji) tanto para el análisis histomorfométrico como para la cuantificación de células que sobreexpresan BMP-2.

15. RADIOLOGÍA

Transcurridas 10 semanas desde la implantación en el defecto óseo en la calota, los animales se anestesiaron y se tomaron imágenes por rayos X de las regiones implantadas utilizando un tubo de rayos X con microfoco durante 34 s, con un voltaje de 35 kV y a una corriente de 100 μ A (IVIS Lumina XR III, PerkinElmer).

16. ESTADÍSTICA

Los datos se han expresado como media + desviación estándar (DE) de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno realizado empleando al menos tres réplicas. En todos los experimentos que han requerido análisis estadístico, los resultados numéricos se exportaron al programa GraphPad Prism 7. El análisis estadístico entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student para datos independientes. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Dunnett. El análisis estadístico de los datos obtenidos mediante análisis de microarrays se llevó a cabo empleando el programa informático Transcriptome Analysis Console. El criterio de significación en el análisis estadístico se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. REGENERACIÓN ÓSEA INDUCIDA POR INTERMEDIARIOS TISULARES FOTOTÉRMICOS

En este apartado se describe la generación de intermediarios tisulares fototérmicos capaces de controlar la secreción de factores de crecimiento que regulan la regeneración ósea.

1.1 Caracterización de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High}

Con el fin de determinar si las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} secretan BMP-2 en función de la aplicación del tratamiento inductor, se sembraron 10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras incubar durante 24 h, se reemplazó el medio de cultivo con medio suplementado o no con rapamicina 10 nM o con AP21967 150 nM. A continuación, los cultivos se mantuvieron a 37 °C/5 % CO₂ o se sometieron a tratamiento térmico durante 30 min mediante inmersión en un baño termostatzado a 44 °C. Una vez finalizado el tratamiento térmico, los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C/5 % CO₂ y se cuantificaron los niveles del factor de crecimiento en el medio de cultivo. En comparación con células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} no tratadas, el tratamiento térmico en presencia de dimerizador conduce a un incremento muy notable en la secreción de BMP-2. No se detectaron diferencias significativas entre la secreción del factor en células no tratadas y entre células que fueron sometidas únicamente a tratamiento térmico o únicamente a tratamiento con dimerizador. Cabe destacar que la secreción de BMP-2 inducida en presencia de AP21967 fue menor que la inducida en presencia de rapamicina (Fig. 3).

La bioactividad del factor de crecimiento secretado tras el tratamiento inductor se ensayó mediante un modelo *ex vivo* que emplea explantes aórticos de ratón, con el fin de evaluar cambios en la formación de estructuras tubulares como consecuencia de la aplicación de estímulos. Los explantes se cultivaron en los medios condicionados por células C3H/10T1/2-BMP-2^{High}, sometidas o no a tratamiento térmico en presencia de AP21967 como se ha descrito anteriormente, cuantificándose el área de las estructuras tubulares en el

momento de añadir los medios condicionados, así como tras 3, 5 y 7 días de incubación (Fig. 4).

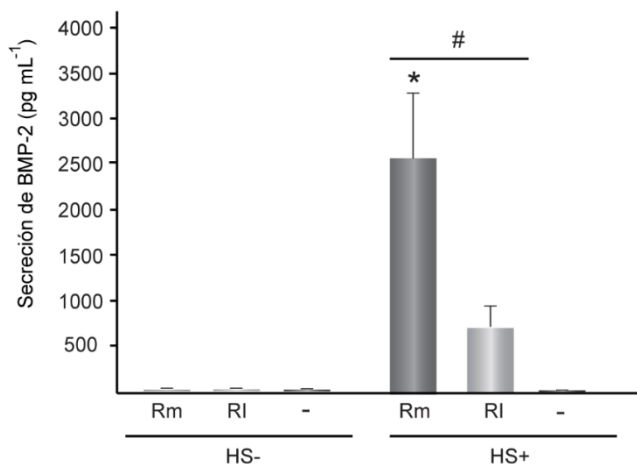


Figura 3. Secreción de BMP-2 en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} sometidas a tratamiento térmico en presencia de dimerizador. Concentración de BMP-2 en el medio de cultivo de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} tratadas con rapamicina 10 nM (Rm), rapálogo AP21967 150 nM (RI) o no tratadas (-) y sometidas (HS+) o no (HS-) a tratamiento térmico a 44 °C durante 30 min. La gráfica muestra los valores promedio + DE de la concentración de BMP-2. #: $p < 0,05$ comparado con células no sometidas a tratamiento térmico o sometidas a dicho tratamiento en ausencia de dimerizador. *: $p < 0,05$ comparado con células tratadas con RI y sometidas a tratamiento térmico.

Se observó un aumento significativo del área de las estructuras tubulares, de aproximadamente 1 mm², en los explantes cultivados durante 7 días con medio condicionado por células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} sometidas a tratamiento térmico en presencia de AP21967. Por el contrario, no se observó incremento alguno del área de las estructuras cuando la incubación se realizó con medios condicionados por células que habían sido sometidas únicamente a tratamiento con AP21967. Estos resultados indican que los medios condicionados por células CH3/10T1/2-BMP-2^{High} sometidas a tratamiento inductor, que contienen niveles muy superiores de BMP-2 que los procedentes de células no sometidas a tratamiento inductor, son bioactivos. Se realizaron experimentos similares en los que se utilizó rapamicina como agente dimerizador sin observarse variación significativa del área de las estructuras tubulares en explantes tratados con medios condicionados por células sometidas o no a tratamiento térmico en presencia de rapamicina (datos no mostrados). Este resultado podría justificarse

por el efecto inhibitorio que ejerce la rapamicina sobre la proliferación de células endoteliales (Laschke y col., 2006; Wang y col., 2017).

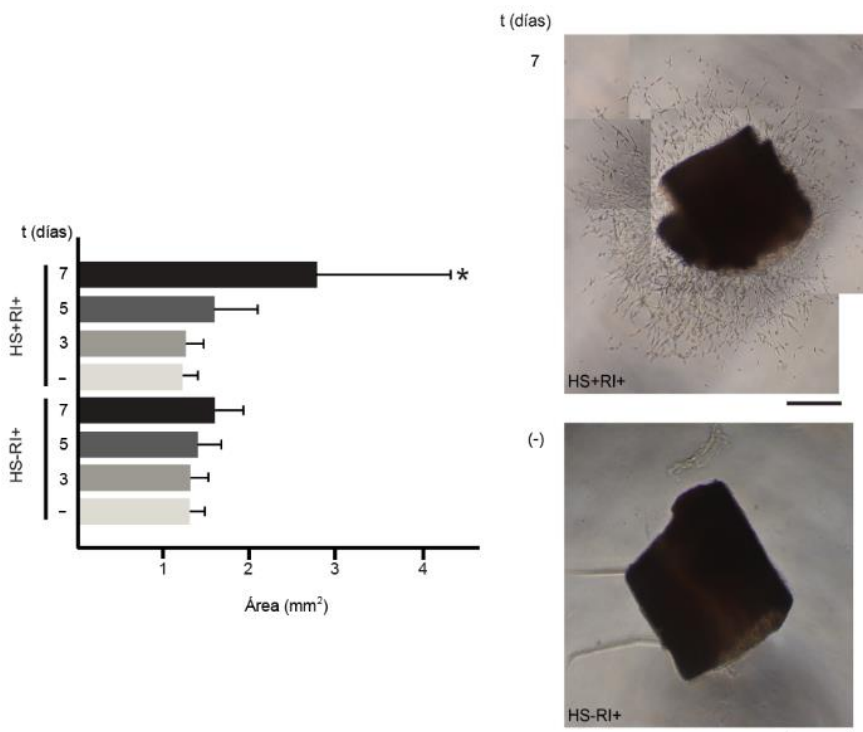


Figura 4. Formación de estructuras tubulares en anillos aórticos cultivados con medios condicionados por células C3H/10T1/2-BMP-2^{High}. El gráfico muestra el área de las estructuras tubulares que emergen de anillos aórticos. Se muestra el valor promedio + DE del área de las estructuras en el momento de añadir los medios condicionados (-) y al cabo de 3, 5 y 7 días. *: $p < 0,05$ comparado con el resto de condiciones, $n = 3$. Las imágenes muestran las estructuras tubulares emergiendo del anillo aórtico incubado con medio condicionado por células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} tratadas con AP21967 150 nM y sometidas (HS+RI+) o no (HS-RI+) a tratamiento térmico a 44 °C durante 30 min tras 7 días de incubación o en el momento de añadir el medio condicionado (-). Escala: 500 µm.

1.2 Caracterización de intermediarios tisulares fototérmicos

Tras determinar que el tratamiento inductor de las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} estimula notablemente la secreción de BMP-2, y que dicha BMP-2 es bioactiva, incorporamos estas células en hidrogeles fototérmicos con el fin de generar intermediarios tisulares que regulen la secreción del factor tras irradiación NIR en presencia de dimerizador. Para ello se prepararon hidrogeles de fibrina conteniendo 4×10^6 células mL^{-1} y HGNP a $20\text{--}40 \mu\text{g mL}^{-1}$, que se denominaron NIR-BMP-2-HG. Tras un día de incubación a 37 °C/5 % CO_2 , los hidrogeles se

irradiaron con un láser NIR que emite a 44 mW mm^{-2} . La zona irradiada de los hidrogeles experimentó un significativo calentamiento local, incrementando rápidamente su temperatura superficial de forma proporcional a la concentración de HGNP utilizada durante la polimerización (Fig. 5). La temperatura de la superficie de los hidrogeles, de $30,17 \pm 0,84 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en el momento en que comenzó la irradiación, experimentó un incremento máximo de $11,20 \pm 0,60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tras irradiar durante 15 min los hidrogeles en los que se habían incluido HGNP a $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Datos previos de nuestro grupo de investigación indicaban que este incremento de temperatura resulta óptimo para inducir en células incluidas en los hidrogeles, *in vitro* e *in vivo*, la expresión de otros transgenes controlados por el circuito génico activable por calor y dependiente de dimerizador (Martin-Saavedra y col., 2014). Los hidrogeles preparados con HGNP a concentraciones de 20 o $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dan lugar a incrementos de temperatura que son insuficientes o excesivos, respectivamente, para inducir la expresión transgénica. A la vista de estos resultados, los experimentos subsiguientes se realizaron empleando hidrogeles conformados con HGNP a $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

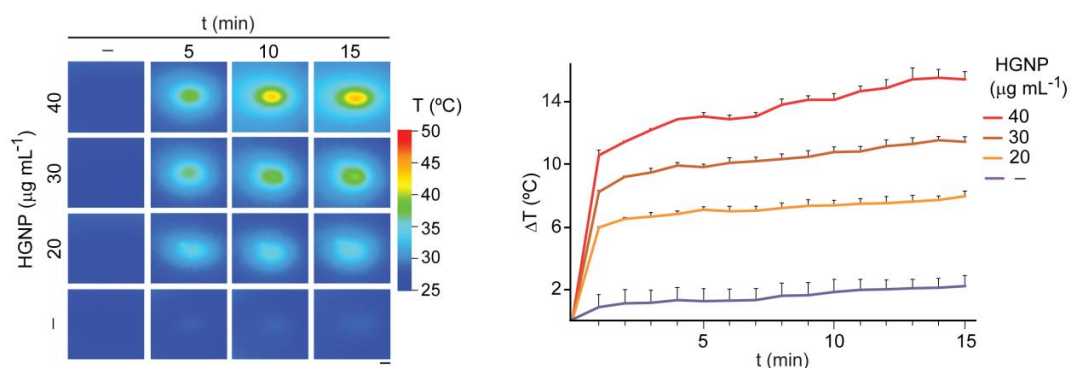


Figura 5. Actividad fototérmica de NIR-BMP-2-HG. Termografías IR de NIR-BMP-2-HG polimerizados con HGNP a las concentraciones indicadas o desprovistos de HGNP (-) que se cultivaron durante 1 día, irradiándose a continuación con un láser NIR durante los tiempos indicados. El gráfico muestra los valores promedio + DE de los aumentos máximos de temperatura detectados durante la irradiación NIR, $n = 3$. Barra de escala: 1 mm.

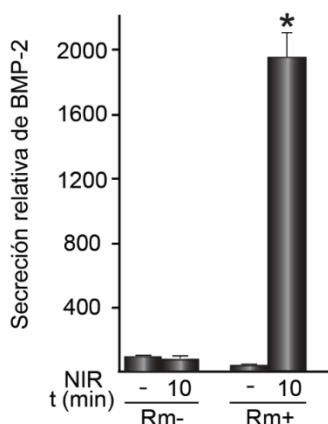


Figura 6. Secreción de BMP-2 por NIR-BMP-2-HG sometidos a irradiación NIR en presencia de rapamicina. Un día después de su polimerización con HGNP a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, los NIR-BMP-2-HG se irradiaron durante 10 min en presencia (Rm+) o ausencia (Rm-) de rapamicina 10 nM incubándose a continuación durante 1 día. Los datos son relativos a los niveles de BMP-2 detectados en el medio condicionado de hidrogeles no tratados ($39,6 \pm 2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), a los que se les dio el valor arbitrario de 100, $n = 3$. *: $p < 0.05$ comparado con el resto de condiciones

1.3 Secreción controlada de BMP-2 en intermediarios tisulares fototérmicos

Tras observar que la irradiación de NIR-BMP-2-HG polimerizados con HGNP a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ induce un incremento en la temperatura de los hidrogeles suficiente para activar el circuito génico inducible por calor y dependiente de rapamicina, evaluamos si este estímulo incrementa la secreción de BMP-2 en las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en estos hidrogeles. Se observó que la irradiación NIR durante 10 min en presencia de rapamicina 10 nM condujo a un importante incremento en la secreción de BMP-2 al medio de cultivo, determinada 24 h después de aplicar el tratamiento inductor (Fig. 6). Los medios de cultivo de hidrogeles que fueron tratados únicamente con rapamicina o únicamente sometidos a irradiación NIR no experimentaron variación significativa en los niveles de BMP-2 con respecto a los de hidrogeles no tratados.

Con el fin de investigar si la secreción de BMP-2 se modulaba en función del tiempo de exposición a la luz NIR, se prepararon NIR-BMP-2-HG que se trataron con rapamicina y se sometieron o no a irradiación durante periodos de tiempo que oscilaron entre 7,5 y 15 min. Tras un día de incubación, la

concentración de BMP-2 en el medio de cultivo de hidrogeles irradiados durante 7,5 min fue unas 8 veces superior a la cuantificada en hidrogeles no irradiados. Cuando la irradiación se prolongó a 10 min, la secreción del factor transgénico incrementó aproximadamente hasta 20 veces (Fig. 7A). Los ensayos de inmunotinción revelaron que este tiempo de exposición resulta en la sobreexpresión de BMP-2 en más del 80 % de las células incluidas en los hidrogeles (Fig. 7B). Cuando la irradiación se prolongó durante 12,5 o 15 min se liberaron cantidades de BMP-2 superiores a las cuantificadas en hidrogeles irradiados durante 7,5 min, pero inferiores a los irradiados durante 10 min. A continuación, quisimos determinar si la secreción inducida de BMP-2 disminuía tras eliminar el dimerizador del medio de cultivo y, de ser así, si podía ser reinducida de nuevo. Para ello, un día después de la irradiación NIR, el medio de cultivo de los hidrogeles se reemplazó por medio carente de rapamicina. Tras incubarlos durante tres días, no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de BMP-2 cuantificados en los medios de hidrogeles que habían sido sometidos o no a irradiación (Fig. 7A). Una segunda ronda de irradiación NIR en presencia de rapamicina, aplicada cinco días después de la primera ronda, incrementó de nuevo la secreción de BMP-2 (Fig. 7A). Tal y como se observó tras la primera ronda de irradiación, la secreción de BMP-2 dependía del tiempo de exposición al láser. En comparación con NIR-BMP-2-HG no irradiados, la irradiación durante 10 o 12,5 min aumentó la secreción de BMP-2 unas 12 veces, mientras que 7,5 min dio lugar a un aumento similar al observado tras la primera ronda de activación. Cuando la irradiación se prolongó a 15 min, se cuantificaron niveles de proteína similares a los de hidrogeles irradiados durante 7,5 min.

Con el fin de explorar si el tratamiento activador afecta a la viabilidad de las células incluidas en los hidrogeles, cinco días después de cada ronda de irradiación NIR se realizaron ensayos de actividad metabólica (Fig. 8A). Se observó una disminución gradual de dicha actividad en función del tiempo de exposición al láser (Fig. 8B). Para determinar si esta disminución se debía a un calentamiento letal en la zona de incidencia del láser en los hidrogeles, éstos se

incubaron con calceína-AM y EthD-1. El análisis mediante microscopía confocal indicó que el porcentaje de células vivas en la región irradiada por el láser disminuía en función del tiempo de irradiación (Fig. 8C).

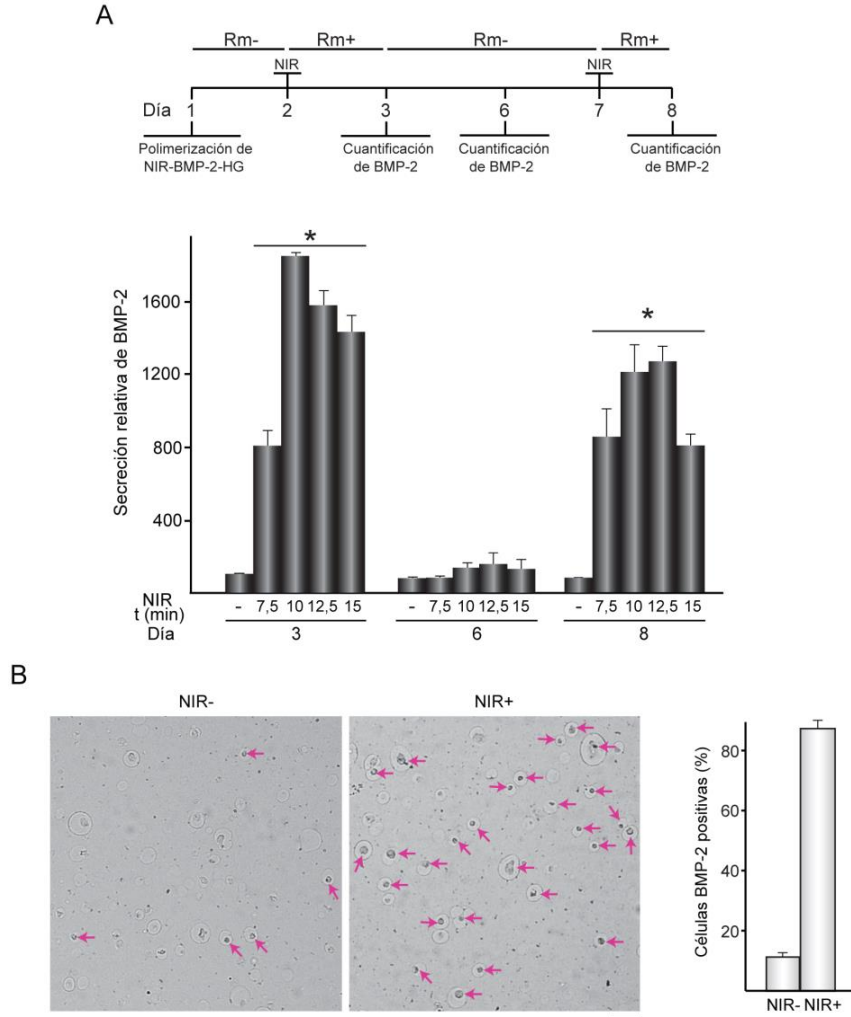


Figura 7. Control de la producción de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG. (A) El esquema representa la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR, cultivo en presencia (Rm+) o ausencia (Rm-) de rapamicina 10 nM y cuantificación de BMP-2. En los días 3 y 6, el medio se recolectó y se reemplazó por medio carente de rapamicina. El gráfico muestra la secreción de BMP-2 en medios condicionados por NIR-BMP-2-HG. Los datos son relativos a los niveles de BMP-2 detectados en el día 3 en el medio condicionado por hidrogeles no irradiados ($46,6 \pm 10,3 \text{ pg mL}^{-1}$), a los que se les dio el valor arbitrario de 100, $n = 3$. (B) Tinción inmunohistoquímica de BMP-2 en secciones de hidrogeles irradiados (NIR+) o no (NIR-) en presencia de rapamicina y posteriormente incubados durante 24 h. El histograma muestra el porcentaje de células positivas para BMP-2, $n = 3$. *: $p < 0,05$ comparado con muestras no irradiadas. Barra de escala: 50 μm .

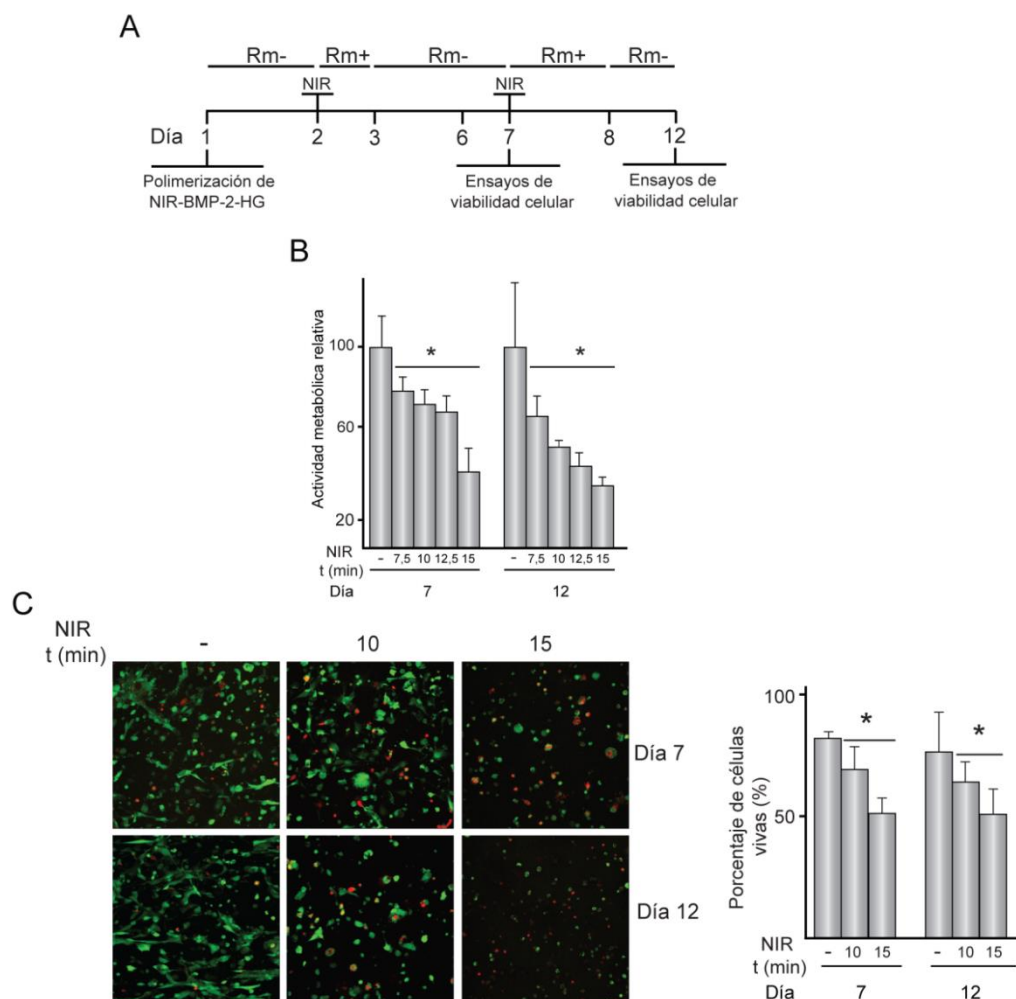


Figura 8. Viabilidad de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG. (A) El esquema representa la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR, cultivo en presencia (Rm+) o ausencia (Rm-) de rapamicina 10 nM y determinación de la viabilidad celular. En los días 3, 6 y 8 el medio se reemplazó por medio carente de rapamicina. (B) El histograma muestra la actividad metabólica de las células contenidas en NIR-BMP-2-HG irradiados durante los tiempos indicados. Los datos son relativos a los valores detectados a día 7 y 12 en hidrogeles no irradiados a los que se les dio un valor arbitrario de 100, $n = 3$. (C) Las imágenes de microscopía confocal muestran células vivas (verde) y muertas (rojo) en el área de incidencia del láser. El histograma muestra el porcentaje de células vivas en el área de incidencia del láser. *: $p < 0,05$ comparado con muestras no irradiadas. Barra de escala: 50 μm .

Es interesante resaltar que, aunque la irradiación durante tiempos prolongados reduce notablemente la viabilidad de las células incluidas en NIR-BMP-2-HG, la población celular aún conserva la capacidad de producir cantidades significativas de factor de crecimiento transgénico (Fig. 7). En base a

los resultados obtenidos tanto en cuanto a capacidad de secreción de BMP-2 como al grado de afectación de la viabilidad celular, se seleccionó el tiempo de irradiación de 10 min para la realización de todos los experimentos subsiguientes ya que, en comparación a tiempos de exposición superiores, induce la producción de cantidades sustanciales de BMP-2 afectando en menor medida a la viabilidad de las células.

Finalmente, se investigó si la irradiación de NIR-BMP-2-HG en presencia del agente dimerizador AP21967 incrementaba eficientemente la secreción de BMP-2. Para ello, 1 y 6 días después de su polimerización, los hidrogeles se sometieron a dos rondas de tratamiento inductor de forma similar a lo realizado en los ensayos que emplearon rapamicina. Como se puede observar en la figura 9, un día después de la primera irradiación NIR en presencia de AP21967 150 nM, la secreción de BMP-2 incrementó unas 16 veces con respecto a la de hidrogeles no irradiados. Una segunda ronda de irradiación NIR en presencia de AP21967, aplicada cinco días después de la primera ronda, reindujo la secreción de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG hasta alcanzar niveles similares a los logrados después de la primera activación (Fig. 9).

1.4 Degradación de NIR-BMP-2-HG

A continuación, se estudió el perfil de degradación *in vitro* de los intermediarios tisulares, sometidos o no a irradiación NIR, así como la capacidad de migración de las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en ellos. Para ello, se prepararon NIR-BMP-2-HG y se sometieron a irradiación NIR al cabo de 1 y 6 días de ser polimerizados, incubándose durante 45 días (Fig. 10). Como control, se emplearon NIR-BMP-2-HG que no fueron sometidos a irradiación.

A lo largo del período de observación se detectó una disminución progresiva del diámetro de los NIR-BMP-2-HG, irradiados o no.

Se observó que la irradiación de NIR-BMP-2-HG retrasa su degradación, como lo demuestra el hecho de que a los 30 y 45 días el diámetro de los hidrogeles irradiados fue significativamente mayor que el de los no irradiados (Fig. 10B). La degradación de NIR-BMP-2-HG se correlaciona con el incremento en la capacidad de migración de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} desde el hidrogel hacia el plástico de cultivo. Dicha capacidad de migración aumentó a lo largo del tiempo y fue similar entre hidrogeles irradiados o no (Fig. 10C).

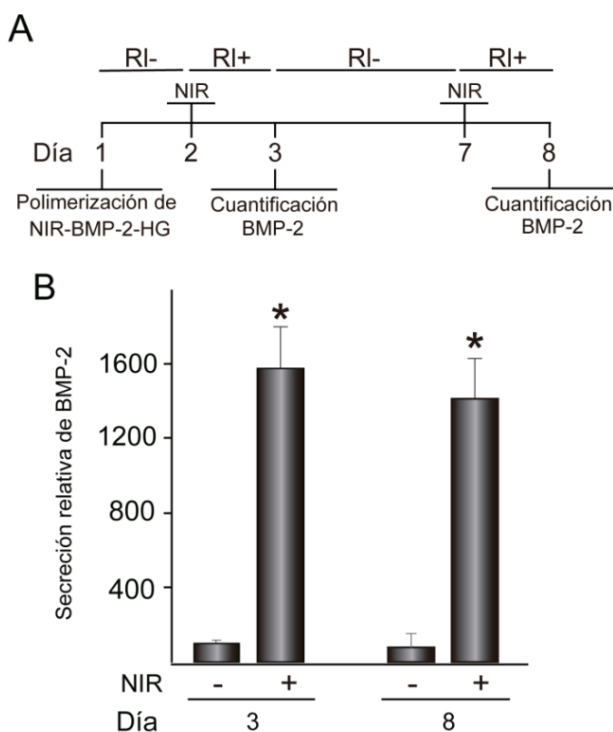


Figura 9. Secreción de BMP-2 por NIR-BMP-2-HG sometidos a irradiación NIR en presencia de AP21967. (A) El esquema representa la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR durante 10 min, cultivo en presencia (RI+) o ausencia (RI-) de AP21967 150 nM y cuantificación de BMP-2. En los días 3 y 6, el medio se recolectó y se reemplazó por medio carente de rapálogo. La gráfica muestra los niveles de BMP-2 en los días 3 y 8 en medios condicionados por NIR-BMP-2-HG que se irradiaron en presencia de RI. Los datos son relativos a los niveles de BMP-2 ($48,2 \pm 27,5 \text{ pg mL}^{-1}$) cuantificados en medios acondicionados de hidrogeles no irradiados en el día 3, a los que se les dio un valor arbitrario de 100, $n = 3$. *: $p < 0,05$ comparado con NIR-BMP-2-HG no irradiados

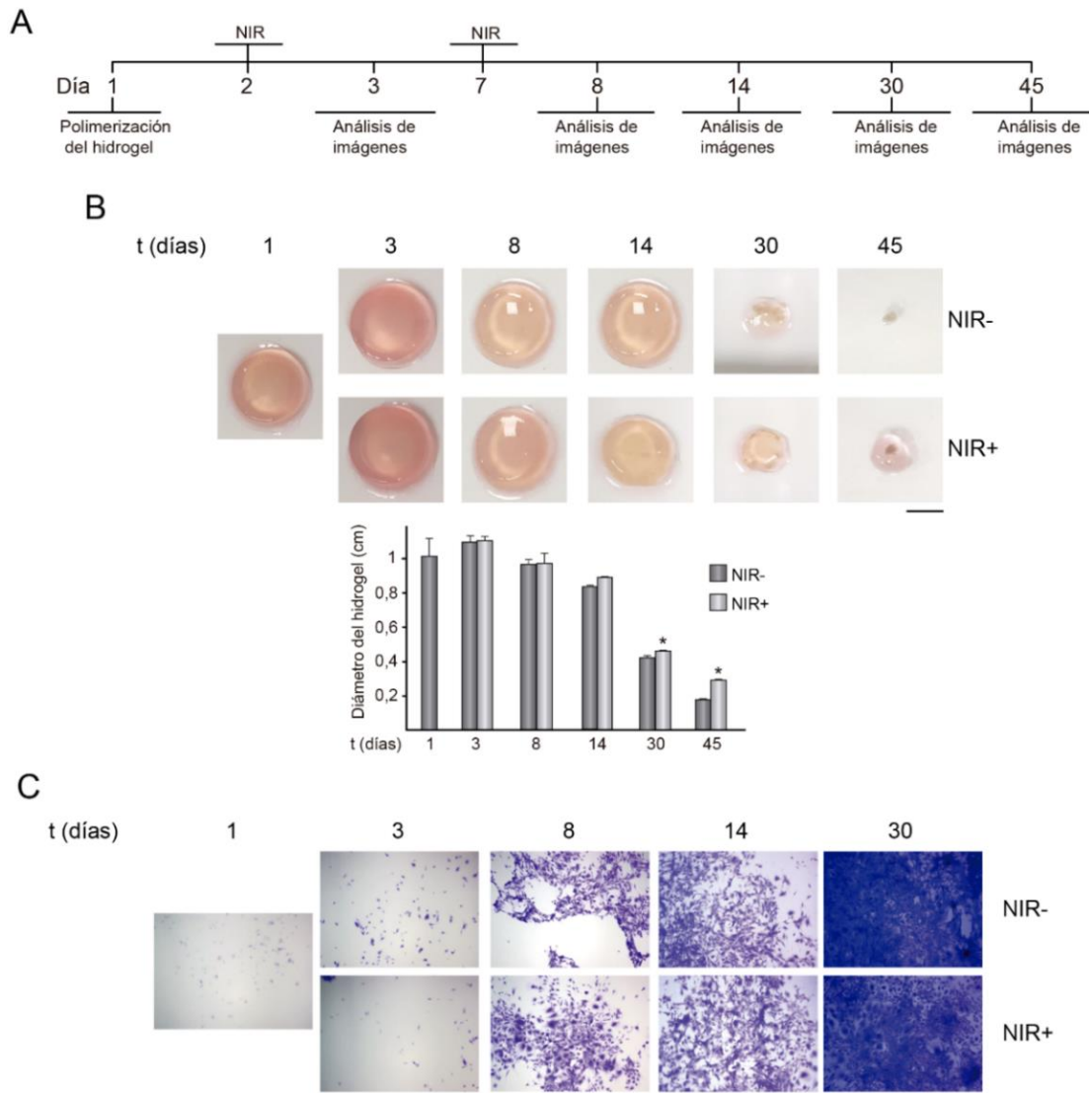


Figura 10. Degradación de NIR-BMP-2-HG y migración de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High}. (A) El esquema representa la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR durante 10 min y análisis de imágenes. Los hidrogeles se cambiaron de pocillo tras cada toma de imagen. (B) Imágenes y valores promedio + DE del diámetro de NIR-BMP-2-HG irradiados (NIR+) o no (NIR-), a los tiempos indicados, n= 3. *: p < 0,05 comparado con NIR-BMP-2-HG no irradiados en el día correspondiente. Barra de escala: 0,5 cm. (C) Imágenes de células teñidas con cristal violeta que migran desde el hidrogel al plástico de cultivo. Barra de escala: 100 μ m.

1.5 Bioactividad de BMP-2 secretada por NIR-BMP-2-HG activados

Una vez demostrada la capacidad de las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en hidrogeles para incrementar la secreción de BMP-2 tras irradiación NIR en presencia de dimerizador, se quiso evaluar si dicha BMP-2 es bioactiva. Para ello, se realizaron ensayos destinados a investigar tanto la potencial actividad autocrina como paracrina del factor de crecimiento.

Para conocer el efecto autocrino de la BMP-2 secretada, se realizó un estudio del transcriptoma de las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en hidrogeles, que fueron sometidos a dos rondas de irradiación NIR en presencia de dimerizador, rapamicina 10 nM o AP21967 150 nM, y que se comparó con el transcriptoma de células únicamente tratadas con el correspondiente dimerizador en ausencia de irradiación NIR (Figs. 11 y 12). Para limitar nuestro estudio a aquellos genes regulados por la secreción de BMP-2, excluyendo todos aquellos que podrían estar modulados por efectos específicos derivados del tratamiento con el dimerizador, el análisis se restringió a aquellos genes codificantes cuyos niveles de expresión aumentaron o disminuyeron significativamente por lo menos 1,5 veces tanto en NIR-BMP-2-HG irradiados en presencia de rapamicina como en presencia de AP21967.

El análisis identificó 160 genes cuya expresión incrementa (Tabla 1) y 6 genes cuya expresión disminuye (Tabla 2) en células que sobreexpresan BMP-2, tanto si el tratamiento activador se realiza en presencia de rapamicina como de AP21967. Los resultados obtenidos para los 50 genes más inducidos pueden ser visualizados en las dos primeras columnas del mapa de calor de la figura 11B. Curiosamente, el análisis ontogénico de los 160 genes inducidos reveló su participación en procesos relacionados con actividad antiviral, entre ellos, respuesta de defensa al virus, respuesta celular al interferón alfa, respuesta celular al interferón beta y respuesta al interferón gamma. También se detectó un enriquecimiento de genes englobados en procesos relacionados con división y ciclo celular (Fig. 11C, Tabla 3).

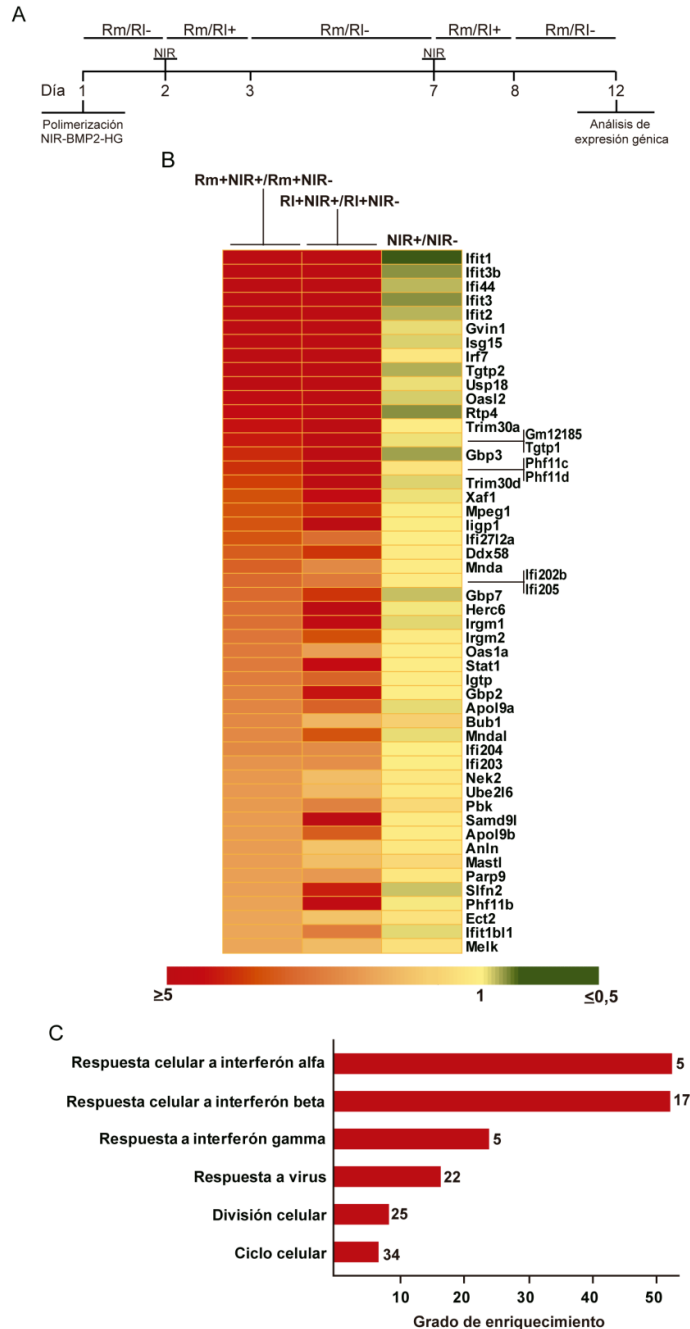


Figura 11. Análisis del transcriptoma de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incorporadas en NIR-BMP-2-HG activados en presencia de dimerizadores. (A) El esquema presenta la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR durante 10 min, cultivo en ausencia (Rm/RI-) o presencia (Rm/RI+) de rapamicina 10 nM (Rm) o AP21967 150 nM (RI) y análisis de expresión génica. En los días 3 y 8, el medio se reemplazó por medio carente de dimerizador. (B) Mapa de calor que muestra los niveles relativos de expresión de los 50 genes más inducidos en células incorporadas en NIR-BMP-2-HG irradiados en presencia de Rm (primera columna, Rm+NIR+) o RI (segunda columna, RI+NIR+) con respecto a los de células que residen en hidrogeles no irradiados que fueron incubados con el correspondiente dimerizador (Rm+NIR- y RI+NIR-, respectivamente). La tercera columna muestra los niveles relativos de expresión de los genes correspondientes en células contenidas en NIR-BMP-2-HG irradiados en ausencia de dimerizador (NIR+) con respecto

a los de células que residen en hidrogeles NIR-BMP-2-HG no tratados y no irradiados (NIR-). (C) Análisis ontogénico de los procesos biológicos en que están implicados los 160 genes cuya expresión se induce tanto en células que residen en NIR-BMP-2-HG irradiados en presencia de Rm como de RI con respecto a células que residen en hidrogeles no irradiados y que fueron incubados con el correspondiente dimerizador. El número total de genes en cada categoría se muestra al final de cada barra.

Tabla 1. Análisis del transcriptoma en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en presencia de dimerizadores. Se muestran los identificadores del ensayo, números de *GeneBank*, símbolos y niveles relativos de ARNm de los genes que aumentan significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que se irradiaron en presencia de rapamicina (NIR+Rm+) o AP21967 (NIR+RI+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no irradiados en presencia de estos mismos dimerizadores (NIR-Rm+ y NIR-RI+, respectivamente). Se muestran los correspondientes valores relativos de ARNm de dichos genes en células que se irradiaron en ausencia de dimerizador (NIR+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no tratados y no irradiados (NIR-). Se indican los valores p, considerándose los cambios estadísticamente significativos cuando dichos valores fueron menores de 0,05, n = 3.

| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm+/NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Nº Acceso a GeneBank | Símbolo del gen |
|----------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------|
| TC1900000504.mm.2 | 13,015 | 1,18E-04 | 12,334 | 9,38E-04 | 0,465 | 0,191 | NM_008331 | <i>lfit1</i> |
| TC1900000502.mm.2 | 9,833 | 6,11E-04 | 13,452 | 0,002 | 0,694 | 0,579 | NM_001005858 | <i>lfit3b</i> |
| TC0300003133.mm.2 | 8,935 | 1,07E-04 | 25,549 | 1,4E-05 | 0,808 | 0,984 | NM_133871 | <i>lfit44</i> |
| TC1900000501.mm.2 | 8,838 | 7,96E-04 | 11,908 | 0,003 | 0,688 | 0,489 | NM_010501 | <i>lfit3</i> |
| TC1900000500.mm.2 | 6,736 | 1,68E-04 | 7,307 | 1,87E-04 | 0,797 | 0,543 | NM_008332 | <i>lfit2</i> |
| TC0700004002.mm.2 | 6,373 | 3,66E-04 | 7,921 | 8,84E-04 | 0,925 | 0,833 | NM_001039160 | <i>Gvin1</i> |
| TC0400004171.mm.2 | 6,089 | 5,10E-04 | 9,166 | 2,11E-04 | 0,892 | 0,804 | NM_015783 | <i>lsg15</i> |
| TC0700004530.mm.2 | 6,001 | 2,67E-04 | 9,054 | 4,66E-04 | 1,193 | 0,646 | NM_001252600 | <i>lrf7</i> |
| TC1100002649.mm.2 | 5,750 | 9,17E-04 | 23,574 | 9,6E-05 | 0,786 | 0,681 | NM_001145164 | <i>Tgtp2</i> |
| TC0600001369.mm.2 | 5,579 | 7,76E-04 | 7,377 | 6,16E-04 | 0,935 | 0,809 | NM_011909 | <i>Usp18</i> |
| TC0500001239.mm.2 | 4,813 | 0,004 | 7,934 | 0,002 | 0,876 | 0,823 | NM_011854 | <i>Oasl2</i> |
| TC1600000346.mm.2 | 4,663 | 0,003 | 5,871 | 0,006 | 0,688 | 0,468 | NM_023386 | <i>Rtp4</i> |
| TC0700003943.mm.2 | 4,475 | 0,001 | 11,254 | 3,3E-05 | 1,074 | 0,758 | NM_009099 | <i>Trim30a</i> |
| TC1100002643.mm.2 | 4,370 | 0,003 | 19,845 | 2,76E-04 | 0,948 | 0,926 | NM_001045540; NM_011579 | <i>Gm12185; Tgtp1</i> |
| TC0300001446.mm.2 | 4,195 | 0,003 | 7,140 | 0,002 | 0,742 | 0,381 | NM_001289492 | <i>Gbp3</i> |
| TC1400002869.mm.2 | 4,132 | 0,002 | 8,388 | 9,06E-04 | 1,248 | 0,470 | NM_199015 | <i>Phf11d; Phf11c</i> |
| TC0700003946.mm.2 | 3,964 | 2,37E-04 | 6,869 | 2,2E-05 | 0,901 | 0,771 | NM_001167828 | <i>Trim30d</i> |
| TC1100000989.mm.2 | 3,763 | 9,69E-04 | 4,624 | 0,003 | 0,946 | 0,884 | NM_001037713 | <i>Xaf1</i> |
| TC1900000246.mm.2 | 3,737 | 0,007 | 4,159 | 0,002 | 0,991 | 0,961 | NM_010821 | <i>Mpeg1</i> |
| TC1800000610.mm.2 | 3,711 | 1,13E-04 | 7,985 | 2E-06 | 0,992 | 0,984 | NM_001146275 | <i>lfgp1</i> |
| TC1200002269.mm.2 | 3,711 | 0,001 | 3,278 | 0,002 | 1,036 | 0,990 | NM_001281830 | <i>lfi27l2a</i> |
| TC0400002434.mm.2 | 3,548 | 1,21E-04 | 4,095 | 6,1E-04 | 1,114 | 0,548 | NM_172689 | <i>Ddx58</i> |
| TC0100003889.mm.2 | 3,473 | 1,5E-05 | 2,788 | 2,44E-04 | 1,075 | 0,732 | NM_001033450 | <i>Mnda</i> |
| TC0100003599.mm.2 | 3,360 | 1,3E-05 | 3,074 | 9,4E-05 | 1,094 | 0,647 | NM_008327 | <i>lfi202b; lfi205</i> |
| TC0300001445.mm.2 | 3,346 | 0,002 | 4,083 | 9,42E-04 | 0,837 | 0,466 | NM_001083312 | <i>Gbp7</i> |
| TC0600003503.mm.2 | 3,250 | 0,002 | 5,710 | 8,18E-04 | 0,970 | 0,738 | NM_025992 | <i>Herc6</i> |
| TC1100002641.mm.2 | 3,235 | 0,001 | 4,787 | 2,06E-04 | 0,911 | 0,929 | NM_008326 | <i>lrgm1</i> |

| | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|------------------|--------------------|
| TC1100004266.mm. 2 | 3,139 | 0,005 | 3,806 | 0,009 | 1,119 | 0,792 | NM_019440 | Irgm2 |
| TC0500003181.mm. 2 | 3,061 | 3,12E-04 | 2,455 | 0,015 | 1,059 | 0,795 | NM_145211 | Oas1a |
| TC0100000375.mm. 2 | 3,043 | 0,004 | 4,531 | 8,15E-04 | 1,052 | 0,775 | NM_0012053 13 | Stat1 |
| TC1100004265.mm. 2 | 3,020 | 0,005 | 3,440 | 0,007 | 1,081 | 0,739 | NM_018738 | Igtp |
| TC0300001447.mm. 2 | 2,914 | 0,018 | 4,442 | 0,004 | 1,019 | 0,668 | NM_010260 | Gbp2 |
| TC1500001809.mm. 2 | 2,870 | 0,001 | 3,451 | 0,001 | 0,920 | 0,954 | NM_0011628 83 | Apol9a |
| TC0200004568.mm. 2 | 2,817 | 0,003 | 2,041 | 0,021 | 1,620 | 0,125 | NM_0011131 79 | Bub1 |
| TC0100003890.mm. 2 | 2,806 | 0,002 | 3,740 | 9,82E-04 | 0,926 | 0,803 | NM_0011708 53 | Mndal |
| TC0100003888.mm. 2 | 2,794 | 2,1E-05 | 2,737 | 7,3E-05 | 1,014 | 0,912 | NM_008329 | Ifi204 |
| TC0100003891.mm. 2 | 2,619 | 8,65E-04 | 2,702 | 0,006 | 0,996 | 0,968 | BC008167 | Ifi203 |
| TC0100001858.mm. 2 | 2,548 | 0,002 | 1,920 | 0,031 | 1,178 | 0,560 | NM_010892 | Nek2 |
| TC0200001222.mm. 2 | 2,545 | 0,008 | 1,989 | 0,040 | 1,133 | 0,571 | NM_019949 | Ube2l6 |
| TC1400000940.mm. 2 | 2,527 | 0,004 | 2,924 | 0,001 | 1,428 | 0,172 | NM_023209 | Pbk |
| TC0600001787.mm. 2 | 2,511 | 0,001 | 5,807 | 5E-5 | 1,115 | 0,789 | NM_010156 | Samd9l |
| TC1500000632.mm. 2 | 2,475 | 0,002 | 3,553 | 2,31E-04 | 1,063 | 0,768 | NM_0011686 60 | Apol9b |
| TC0900001908.mm. 2 | 2,465 | 0,007 | 1,813 | 0,031 | 1,180 | 0,557 | NM_028390 | Anln |
| TC0200003103.mm. 2 | 2,456 | 4,79E-04 | 1,913 | 0,004 | 1,444 | 0,100 | NM_025979 | Mastl |
| TC1600000500.mm. 2 | 2,438 | 8,55E-04 | 2,534 | 4,69E-04 | 1,187 | 0,450 | NM_030253 | Parp9 |
| TC1100001238.mm. 2 | 2,416 | 0,019 | 4,328 | 2,79E-04 | 0,851 | 0,745 | NM_011408 | Sifn2 |
| TC1400002162.mm. 2 | 2,365 | 0,018 | 4,750 | 0,003 | 0,979 | 0,960 | NM_0011643 27 | Phf11b |
| TC0300001757.mm. 2 | 2,332 | 0,002 | 1,825 | 0,016 | 1,265 | 0,318 | NM_0011776 25 | Ect2 |
| TC1900001422.mm. 2 | 2,315 | 0,003 | 3,010 | 6,53E-04 | 0,913 | 0,720 | NM_0011016 0 | Ifi1bl1 |
| TC0400000464.mm. 2 | 2,311 | 0,005 | 1,960 | 0,012 | 1,307 | 0,251 | NM_010790 | Melk |
| TC1400002260.mm. 2 | 2,295 | 0,008 | 1,651 | 0,047 | 1,105 | 0,683 | NM_028039 | Esco2 |
| TC1100001155.mm. 2 | 2,290 | 0,004 | 1,892 | 0,022 | 1,668 | 0,054 | NM_017407 | Spag5 |
| TC0700003862.mm. 2 | 2,288 | 0,002 | 2,019 | 0,019 | 1,223 | 0,425 | NM_0010825 52 | Trim21 |
| TC0200001757.mm. 2 | 2,276 | 0,005 | 1,851 | 0,016 | 1,052 | 0,781 | NM_029617 | Casc5 |
| TC1400002834.mm. 2 | 2,266 | 0,001 | 2,660 | 0,001 | 1,020 | 0,922 | NM_0011594 17 | Irf9 |
| TC1900000529.mm. 2 | 2,238 | 0,038 | 2,166 | 0,019 | 1,535 | 0,159 | NM_010615 | Kif11 |
| TC1800000291.mm. 2 | 2,192 | 0,023 | 1,864 | 0,045 | 1,493 | 0,197 | NM_0011664 06 | Kif20a |
| TC1000000158.mm. 2 | 2,186 | 0,013 | 1,722 | 0,027 | 1,017 | 0,953 | NM_027930 | Mtfr2 |
| TC0700001520.mm. 2 | 2,173 | 0,003 | 2,689 | 9,77E-04 | 1,205 | 0,371 | NM_0012439 16 | Trim34b Trim34a |
| TC1100001242.mm. 2 | 2,151 | 0,019 | 3,047 | 9E-04 | 1,223 | 0,327 | NM_011409 | Sifn3 |
| TC1600001556.mm. 2 | 2,127 | 0,010 | 3,313 | 9,78E-04 | 0,899 | 0,669 | NM_0010395 30 | Parp14 |
| TC1100000475.mm. 2 | 2,112 | 0,013 | 2,094 | 0,009 | 1,377 | 0,219 | NM_134250 | Havcr2 |
| TC0800001863.mm. 2 | 2,103 | 0,005 | 1,556 | 0,05 | 1,261 | 0,338 | NM_0010041 40 | Ckap2 |
| TC0300001289.mm. 2 | 2,096 | 0,009 | 1,850 | 0,018 | 1,352 | 0,304 | NM_197997 | Zgrf1 |
| TC0100003814.mm. 2 | 2,095 | 0,001 | 2,159 | 8,18E-04 | 1,193 | 0,371 | NM_029766 | Dtl |
| TC1600001320.mm. 2 | 2,063 | 0,006 | 1,599 | 0,041 | 1,282 | 0,116 | NM_0011616 23 | Cdc45 |
| TC1900000226.mm. 2 | 2,059 | 7,99E-04 | 3,123 | 2E-06 | 1,352 | 0,107 | NM_025658 | Ms4a4d |
| TC0700003940.mm. 2 | 2,058 | 0,007 | 3,655 | 4,63E-04 | 1,123 | 0,682 | NM_0011460 07 | Trim12c |
| TC0500003180.mm. 2 | 2,052 | 0,024 | 3,121 | 0,005 | 0,906 | 0,835 | NM_011852 | Oas1g |
| TC0500003731.mm. 2 | 2,051 | 0,008 | 3,565 | 4,19E-04 | 1,185 | 0,404 | NM_0012560 05 | Gbp4 |
| TC1100003382.mm. 2 | 2,051 | 0,004 | 2,634 | 9,69E-04 | 0,854 | 0,463 | NM_0011677 43 | Sifn8 |
| TC1600001557.mm. 2 | 2,047 | 0,009 | 2,058 | 0,018 | 0,965 | 0,943 | NM_0010133 71 | Dtx3l |
| TC0800002431.mm. 2 | 2,037 | 0,017 | 2,695 | 0,012 | 1,045 | 0,890 | NM_198095 | Bst2 |
| TC1400001935.mm. 2 | 2,035 | 0,013 | 1,658 | 0,040 | 1,075 | 0,743 | NM_144553 | Dlgap5 |

Resultados

| | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|------------------------|---|
| TC160000746.mm. 2 | 2,034 | 0,010 | 2,031 | 0,009 | 0,996 | 0,965 | NM_0010143 99 | <i>Abi3bp</i> |
| TC0400003366.mm. 2 | 2,031 | 0,037 | 2,292 | 0,023 | 1,639 | 0,116 | NM_134471 | <i>Kif2c</i> |
| TC1000001596.mm. 2 | 2,029 | 0,004 | 2,333 | 0,002 | 0,965 | 0,938 | NM_019963 | <i>Stat2</i> |
| TC1200001306.mm. 2 | 2,027 | 0,001 | 1,533 | 0,031 | 1,205 | 0,315 | NM_133762 | <i>Ncapg2</i> |
| TC0500000494.mm. 2 | 2,026 | 0,014 | 1,785 | 0,019 | 1,723 | 0,026 | NM_019438 | <i>Ncapg</i> |
| TC1100002003.mm. 2 | 2,023 | 0,003 | 2,194 | 0,002 | 1,093 | 0,562 | ENSMUST00 000093902 | <i>Rnf213</i> |
| TC1200001420.mm. 2 | 2,015 | 0,003 | 1,900 | 0,007 | 1,064 | 0,799 | NM_177331 | <i>Gen1</i> |
| TC0700003996.mm. 2 | 2,011 | 0,001 | 2,203 | 8,36E-04 | 1,001 | 0,979 | NM_0012430 39 | <i>Gm4070 ; Gvin1; Gm1775 7; Gm1885 3</i> |
| TC1100002549.mm. 2 | 1,993 | 0,008 | 1,703 | 0,031 | 1,226 | 0,500 | NM_013552 | <i>Hmmr</i> |
| TC1600002148.mm. 2 | 1,979 | 0,040 | 5,843 | 9E-05 | 1,029 | 0,839 | NM_010846 | <i>Mx1</i> |
| TC0700003743.mm. 2 | 1,978 | 0,001 | 1,766 | 0,004 | 1,121 | 0,586 | NM_0010809 95 | <i>Ddias</i> |
| TC0300001587.mm. 2 | 1,974 | 0,009 | 1,918 | 0,005 | 1,312 | 0,207 | NM_0011720 92 | <i>Depdc1a</i> |
| TC0800000659.mm. 2 | 1,963 | 0,011 | 3,205 | 0,002 | 0,928 | 0,714 | ENSMUST00 000070631 | <i>Ddx60</i> |
| TC0X00001276.mm. 2 | 1,956 | 0,019 | 1,638 | 0,031 | 1,238 | 0,309 | NM_145924 | <i>Cenpi</i> |
| TC0500001349.mm. 2 | 1,942 | 0,011 | 2,278 | 0,007 | 0,983 | 0,997 | NM_0010839 25 | <i>Oas1b</i> |
| TC0300000714.mm. 2 | 1,932 | 0,004 | 1,667 | 0,026 | 1,064 | 0,692 | NM_0010334 84 | <i>Iqgap3</i> |
| TC1500001807.mm. 2 | 1,926 | 5,47E-04 | 2,097 | 2,19E-04 | 1,248 | 0,187 | NM_0011646 40 | <i>Apol7a</i> |
| TC1700002286.mm. 2 | 1,921 | 0,015 | 2,240 | 0,001 | 1,199 | 0,361 | NM_028232 | <i>Sgol1</i> |
| TC1700002298.mm. 2 | 1,917 | 3,65E-04 | 1,658 | 0,003 | 1,094 | 0,648 | NM_028370 | <i>Pot1b</i> |
| TC0300001194.mm. 2 | 1,903 | 9,23E-04 | 1,564 | 0,012 | 1,018 | 0,937 | NM_0012895 68 | <i>Sass6</i> |
| TC1300000365.mm. 2 | 1,902 | 0,024 | 2,068 | 0,012 | 1,757 | 0,047 | NM_011452 | <i>Serpinb9 b</i> |
| TC0600001254.mm. 2 | 1,898 | 4E-05 | 1,733 | 1,89E-04 | 0,986 | 0,919 | NM_0010332 44 | <i>Fancd2</i> |
| TC0900002451.mm. 2 | 1,896 | 0,038 | 1,782 | 0,035 | 1,194 | 0,493 | NM_024245 | <i>Kif23</i> |
| TC0200005438.mm. 2 | 1,888 | 0,008 | 2,231 | 0,002 | 0,881 | 0,579 | NM_183162 | <i>Helz2</i> |
| TC0800001639.mm. 2 | 1,878 | 0,021 | 2,005 | 0,005 | 1,464 | 0,092 | NM_011369 | <i>Shcgp1</i> |
| TC1700002558.mm. 2 | 1,874 | 0,022 | 2,894 | 5,88E-04 | 1,069 | 0,581 | NM_011163 | <i>Elf2ak2</i> |
| TC1300002543.mm. 2 | 1,868 | 0,020 | 1,693 | 0,022 | 1,438 | 0,100 | NM_172301 | <i>Ccnb1</i> |
| TC0800001390.mm. 2 | 1,860 | 0,001 | 1,750 | 0,001 | 1,235 | 0,198 | NM_028131 | <i>Cenpn</i> |
| TC0500003175.mm. 2 | 1,853 | 0,039 | 4,142 | 7,79E-04 | 0,884 | 0,770 | NM_145227 | <i>Oas2</i> |
| TC1700002497.mm. 2 | 1,849 | 0,028 | 1,719 | 0,04 | 1,264 | 0,356 | NM_023294 | <i>Ndc80</i> |
| TC0200004440.mm. 2 | 1,840 | 0,002 | 1,704 | 0,012 | 1,156 | 0,496 | NM_0010426 53 | <i>Oip5</i> |
| TC0700003936.mm. 2 | 1,829 | 0,004 | 2,642 | 9,7E-05 | 0,950 | 0,785 | ENSMUST00 000051795 | <i>Trim5</i> |
| TC0X00000958.mm. 2 | 1,812 | 0,026 | 2,145 | 0,004 | 1,530 | 0,072 | NM_008446 | <i>Kif4</i> |
| TC1900000508.mm. 2 | 1,811 | 0,023 | 1,759 | 0,018 | 1,253 | 0,308 | NM_183046 | <i>Kif20b</i> |
| TC0500002896.mm. 2 | 1,808 | 0,003 | 3,376 | 8E-6 | 0,807 | 0,292 | NM_0010396 47 | <i>Gbp11</i> |
| TC0300001408.mm. 2 | 1,801 | 0,007 | 2,221 | 8,18E-04 | 0,919 | 0,565 | NM_009626 | <i>Adh7</i> |
| TC0100002210.mm. 2 | 1,789 | 0,003 | 2,006 | 7,96E-04 | 1,243 | 0,269 | NM_026913 | <i>Mitd1</i> |
| TC1000002639.mm. 2 | 1,784 | 0,007 | 1,672 | 0,012 | 1,478 | 0,050 | NM_029249 | <i>Parpbbp</i> |
| TC0100000766.mm. 2 | 1,779 | 0,027 | 4,030 | 3,3E-05 | 1,495 | 0,081 | NM_013673 | <i>Sp100</i> |
| TC1200002150.mm. 2 | 1,779 | 0,007 | 1,705 | 0,005 | 0,987 | 0,962 | NM_181815 | <i>Cep128</i> |
| TC1100002579.mm. 2 | 1,777 | 2,59E-04 | 2,208 | 6E-06 | 1,594 | 0,001 | NM_024475 | <i>Ublcp1</i> |
| TC0100000426.mm. 2 | 1,768 | 0,014 | 1,575 | 0,034 | 0,986 | 0,930 | NM_0011778 67 | <i>Sgol2a</i> |
| TC1500001183.mm. 2 | 1,759 | 0,026 | 2,168 | 0,005 | 1,320 | 0,259 | NM_148938 | <i>Slc1a3</i> |
| TC1200001030.mm. 2 | 1,757 | 0,010 | 1,884 | 0,018 | 1,340 | 0,239 | NM_026790 | <i>Ifi27</i> |
| TC1900000186.mm. 2 | 1,755 | 7,63E-04 | 1,650 | 0,002 | 1,179 | 0,229 | NM_021890 | <i>Fads3</i> |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|------------------|---------------------------------------|
| TC0100003783.mm. 2 | 1,751 | 0,013 | 1,685 | 0,015 | 1,114 | 0,598 | NM_0010813 63 | <i>Cenpf</i> |
| TC1_GL456221_ran dom0000019.mm.2 | 1,748 | 0,006 | 1,685 | 0,008 | 1,033 | 0,870 | NM_033616 | <i>Csprs</i> |
| TC1100001657.mm. 2 | 1,745 | 0,027 | 1,995 | 0,011 | 1,179 | 0,503 | NM_027320 | <i>Ifi35</i> |
| TC0300000308.mm. 2 | 1,734 | 0,007 | 1,543 | 0,024 | 1,173 | 0,338 | NM_011495 | <i>Plk4</i> |
| TC0700001519.mm. 2 | 1,726 | 4,32E-04 | 1,692 | 6,92E-04 | 1,238 | 0,127 | NM_0010136 16 | <i>Trim6</i> |
| TC1600001807.mm. 2 | 1,720 | 1,49E-04 | 1,982 | 7E-06 | 1,502 | 0,002 | NM_019665 | <i>Arl6</i> |
| TC0700003938.mm. 2 | 1,709 | 0,001 | 1,948 | 2,24E-04 | 0,932 | 0,608 | NM_023835 | <i>Trim12a</i> |
| TC1300001171.mm. 2 | 1,706 | 0,008 | 1,546 | 0,020 | 1,123 | 0,561 | NM_021790 | <i>Cenpk</i> |
| TC0300000769.mm. 2 | 1,706 | 0,005 | 1,750 | 0,009 | 0,998 | 0,947 | NM_0010385 87 | <i>Adar</i> |
| TC1300000362.mm. 2 | 1,703 | 0,023 | 1,592 | 0,049 | 1,048 | 0,969 | NM_011454 | <i>Serpnb6 b</i> |
| TC1200001834.mm. 2 | 1,696 | 0,040 | 1,679 | 0,047 | 1,235 | 0,385 | NM_172578 | <i>Mis18bp 1</i> |
| TC1100004159.mm. 2 | 1,675 | 0,028 | 2,239 | 0,002 | 1,178 | 0,422 | NM_011150 | <i>Lgals3bp</i> |
| TC1900001419.mm. 2 | 1,666 | 0,001 | 1,694 | 8,03E-04 | 1,250 | 0,099 | NM_0011111 00 | <i>Lipa</i> |
| TC1500002217.mm. 2 | 1,662 | 0,028 | 1,615 | 0,023 | 1,260 | 0,259 | NM_0012538 08 | <i>Racgap1</i> |
| TC1100003379.mm. 2 | 1,660 | 0,036 | 2,311 | 0,001 | 0,995 | 0,875 | NM_172796 | <i>Slnf9</i> |
| TC0100002033.mm. 2 | 1,655 | 0,030 | 1,570 | 0,03 | 1,190 | 0,390 | NM_008563 | <i>Mcm3</i> |
| TC0200005271.mm. 2 | 1,642 | 0,007 | 1,540 | 0,016 | 1,167 | 0,378 | NM_011497 | <i>Aurka</i> |
| TC0300000266.mm. 2 | 1,641 | 0,004 | 1,822 | 5,34E-04 | 1,176 | 0,282 | NM_0011014 78 | <i>D3Erd2 54e</i> |
| TC1500000826.mm. 2 | 1,633 | 0,011 | 1,684 | 0,008 | 0,992 | 0,991 | NM_0011686 72 | <i>Gtse1</i> |
| TC0500003730.mm. 2 | 1,618 | 0,041 | 2,960 | 0,001 | 1,098 | 0,558 | NM_172777 | <i>Gbp9</i> |
| TC1300002773.mm. 2 | 1,615 | 0,026 | 1,554 | 0,035 | 1,197 | 0,369 | NM_0010386 51 | <i>Zfp953</i> |
| TC0300002802.mm. 2 | 1,579 | 0,038 | 1,796 | 0,007 | 1,055 | 0,742 | NM_011693 | <i>Vcam1</i> |
| TC1100004291.mm. 2 | 1,573 | 0,016 | 1,783 | 0,003 | 0,766 | 0,108 | NM_0012814 72 | <i>Psme2b</i> |
| TC1400002870.mm. 2 | 1,569 | 0,028 | 1,812 | 0,015 | 0,937 | 0,596 | NM_0010810 24 | <i>Setdb2; Phf11c; Phf11d</i> |
| TC0X00001658.mm. 2 | 1,566 | 0,029 | 1,686 | 0,021 | 1,204 | 0,381 | NM_026887 | <i>Ap1s2</i> |
| TC0400003390.mm. 2 | 1,565 | 0,027 | 1,817 | 0,007 | 1,674 | 0,019 | NM_023223 | <i>Cdc20lar</i> |
| TC1000001579.mm. 2 | 1,562 | 0,003 | 2,041 | 2,9E-05 | 1,335 | 0,053 | NM_008921 | <i>Prim1</i> |
| TC0200001889.mm. 2 | 1,559 | 0,002 | 1,666 | 5,68E-04 | 1,551 | 0,003 | NM_175154 | <i>Galk2</i> |
| TC1000001593.mm. 2 | 1,556 | 0,04 | 2,403 | 5,60E-04 | 1,593 | 0,030 | NM_0011360 82 | <i>Timeless</i> |
| TC0200004366.mm. 2 | 1,548 | 0,002 | 1,749 | 1,93E-04 | 1,141 | 0,298 | NM_181416 | <i>Arhgap1 1a</i> |
| TC0600002565.mm. 2 | 1,544 | 0,036 | 1,641 | 0,021 | 0,974 | 0,860 | NM_008638 | <i>Mthfd2</i> |
| TC1100000058.mm. 2 | 1,539 | 0,009 | 1,519 | 0,012 | 1,507 | 0,009 | NM_0012430 43 | <i>Ap1b1</i> |
| TC0X00000735.mm. 2 | 1,539 | 0,002 | 2,655 | 0 | 1,692 | 3,48E-04 | NM_0010303 07 | <i>Dkc1</i> |
| TC0400000567.mm. 2 | 1,539 | 0,011 | 1,515 | 0,011 | 1,217 | 0,189 | NM_008017 | <i>Smc2</i> |
| TC03000002627.mm. 2 | 1,537 | 0,005 | 1,961 | 6,6E-05 | 1,140 | 0,324 | NM_174875 | <i>Atg4a; Atg4a-ps</i> |
| TC1300000019.mm. 2 | 1,522 | 8,57E-04 | 1,547 | 4,61E-04 | 1,409 | 0,004 | NM_013778 | <i>Akr1c13</i> |
| TC0900002724.mm. 2 | 1,506 | 0,026 | 1,595 | 0,012 | 0,817 | 0,397 | NM_173386 | <i>Mb21d1</i> |
| TC1700000269.mm. 2 | 1,505 | 0,016 | 1,547 | 0,017 | 1,222 | 0,225 | NM_172486 | <i>Zfp677</i> |
| TC0900000033.mm. 2 | 1,504 | 0,028 | 1,641 | 0,010 | 1,202 | 0,246 | NM_009808 | <i>Casp12</i> |
| TC0X00003276.mm. 2 | 1,503 | 0,028 | 1,884 | 0,001 | 1,369 | 0,055 | NM_011147 | <i>Ppef1</i> |
| TC1100000798.mm. 2 | 1,503 | 0,012 | 1,520 | 0,009 | 1,040 | 0,632 | NM_0010395 36 | <i>Pigl</i> |

Tabla 2. Análisis del transcriptoma en las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en presencia de dimerizadores. Se muestran los niveles relativos de ARNm de los genes que disminuyen significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que fueron irradiados en presencia de rapamicina (NIR+Rm+) o AP21967 (NIR+RI+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no irradiados en presencia de estos mismos dimerizadores (NIR-Rm+ y NIR-RI+, respectivamente). Se muestran los correspondientes valores relativos de ARNm de dichos genes en células que se irradiaron en ausencia de dimerizador (NIR+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no tratados y no irradiados (NIR-). Todos los demás detalles son como en la Tabla 1.

| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm+/ NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/ NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Nº Acceso a GeneBank | Símbolo del gen |
|----------------------|--|----------------------------|--|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| TC1500001848.mm.2 | 0,651 | 0,015 | 0,642 | 0,017 | 1,098 | 0,696 | NM_130859 | <i>Card10</i> |
| TC0600000227.mm.2 | 0,634 | 0,025 | 0,569 | 0,012 | 0,533 | 0,008 | NM_001101486 | <i>Fam71f2</i> |
| TC1100003325.mm.2 | 0,615 | 0,003 | 0,594 | 0,004 | 0,757 | 0,068 | NM_019409 | <i>Omg</i> |
| TC1700000505.mm.2 | 0,511 | 3,13E-04 | 0,511 | 2,11E-04 | 0,705 | 0,025 | NM_008842 | <i>Pim1</i> |
| TC1700000703.mm.2 | 0,460 | 0,014 | 0,517 | 0,016 | 0,802 | 0,420 | NM_133662 | <i>Ier3</i> |
| TC1100003055.mm.2 | 0,444 | 0,031 | 0,477 | 0,017 | 0,737 | 0,301 | ENS MUST0000018918 | <i>Cd68</i> |

Con el fin de investigar si los cambios en el transcriptoma de células que sobreexpresan BMP-2 son causa del incremento en la temperatura que experimenta el hidrogel tras la irradiación NIR, se investigaron comparativamente los niveles de los transcritos regulados en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} contenidas en NIR-BMP-2-HG que, en ausencia de dimerizador, se sometieron o no a dos rondas de radiación NIR. Sólo 9 de los 160 genes (5,6 %) cuya expresión incrementa por la irradiación en presencia de dimerizadores, incrementaron significativamente su expresión tras irradiación NIR en ausencia de dimerizador (Tabla 1).

En ausencia de dimerizadores, la irradiación NIR aumentó significativamente los niveles de transcripción de 149 genes (Tabla 4), mientras que disminuyó la de 114 (Tabla 5). Los resultados obtenidos para los 50 genes más inducidos y reprimidos por NIR pueden ser visualizados en las terceras columnas de los mapas de calor de la figura 12. El análisis ontogénico de los genes cuya expresión se modula exclusivamente por NIR no reveló ningún enriquecimiento de los procesos biológicos detectados en células que sobreexpresan BMP-2 (Tabla 6). El patrón de expresión de los genes regulados por NIR variaba notablemente cuando la irradiación se realizaba en presencia de rapamicina o AP21967, ya que sólo se estimulaba la expresión de 11 (7,4%) o

50 (33,6%), respectivamente, de los 149 genes inducidos como consecuencia de la exposición a NIR (Fig. 12B, dos primeras columnas del mapa de calor de la izquierda, Tabla 4). Las diferencias eran aún más pronunciadas cuando se comparaban los niveles de expresión de los genes reprimidos por NIR. La irradiación en presencia de rapamicina o AP21967 sólo disminuyó la expresión de 3 (2,6%) o 14 (12,3%), respectivamente, de los 114 genes reprimidos por irradiación NIR en ausencia de dimerizador (Fig. 12B, dos primeras columnas del mapa de calor de la derecha, Tabla 5).

Tabla 3. Análisis ontogénico de genes cuya expresión se induce en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en presencia de dimerizadores. El análisis incluyó los genes cuyos niveles relativos de ARNm aumentan significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que fueron irradiados en presencia de rapamicina o de AP21967, con respecto a células incluidas hidrogeles no irradiados. Se muestran los términos, número de genes, valor p, grado de enriquecimiento y símbolo de los genes.

| Término | Nº de Genes | Valor p | Grado de enriquecimiento | Genes |
|---|-------------|----------|--------------------------|--|
| GO:0051988 <i>regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore</i> | 4 | 1,66E-05 | 71,754 | <i>Nek2, Spag5, Racgap1, Ect2</i> |
| GO:0044406 <i>adhesion of symbiont to host</i> | 4 | 3,93E-05 | 55,809 | <i>Gbp7, Gbp9, Gbp3, Gbp2</i> |
| GO:0035457 <i>cellular response to interferon-alpha</i> | 5 | 1,77E-06 | 52,321 | <i>Ifit3, Ifit2, Ifit1, Ifit3b, Ifi204</i> |
| GO:0035455 <i>response to interferon-alpha</i> | 5 | 1,77E-06 | 52,321 | <i>Bst2, Tgtp1, Tgtp2, Eif2ak2, Adar</i> |
| GO:0035458 <i>cellular response to interferon-beta</i> | 17 | 8,52E-24 | 52,065 | <i>Gm12185, Irgm1, Irgm2, Stat1, Ifi202b, Ifit3, Ifit1, Igtf, Trim6, Igtf1, Tgtp1, Tgtp2, Ifi203, Gbp3, Gbp2, Ifi205, Ifi204</i> |
| GO:0000281 <i>mitotic cytokinesis</i> | 7 | 1,12E-07 | 29,395 | <i>Ckap2, Kif23, Kif4, Anln, Mlt1, Racgap1, Kif20a</i> |
| GO:0042632 <i>defense response to protozoan</i> | 6 | 3,50E-06 | 25,114 | <i>Gbp7, Irgm2, Gbp9, Igtf1, Gbp3, Gbp2</i> |
| GO:0034341 <i>response to interferon-gamma</i> | 5 | 4,90E-05 | 24,148 | <i>Irgm2, Bst2, Tgtp1, Tgtp2, Trim21</i> |
| GO:0009615 <i>response to virus</i> | 16 | 1,26E-16 | 23,918 | <i>Bst2, Oas2, Ddx58, Ifit3, Ifit2, Ifit1, Oas1, Ifi2712a, Ddx60, Oas1b, Tgtp1, Tgtp2, Oas1a, Mx1, Eif2ak2, Adar</i> |
| GO:0045071 <i>negative regulation of viral genome replication</i> | 6 | 4,89E-06 | 23,544 | <i>Bst2, Isg15, Trim6, Oas1b, Eif2ak2, Adar</i> |
| GO:0007059 <i>chromosome segregation</i> | 13 | 5,29E-12 | 18,342 | <i>Cenpn, Setdb2, Kif11, Nek2, Sgol1, Cenpf, Ndc80, Escoc2, Sgol2a, Kif2c, Spag5, Olp5, Bub1</i> |
| GO:0051607 <i>defense response to virus</i> | 22 | 1,45E-19 | 16,542 | <i>Bst2, Slin9, Trim34a, Slin8, Oas2, Ifit3b, Stat2, Ddx58, Ifit3, Ifit2, Ifit1, Isg15, Mbt21d1, Oas1, Ddx60, Oas1b, Oas1a, Eif2ak2, Mx1, Oas1g, Ifit1b1, Adar</i> |
| GO:0032467 <i>positive regulation of cytokinesis</i> | 4 | 0,002 | 15,220 | <i>Kif23, Kif20b, Racgap1, Ect2</i> |
| GO:0007018 <i>microtubule-based movement</i> | 6 | 3,83E-04 | 9,661 | <i>Kif23, Kif2c, Kif11, Kif4, Kif20b, Kif20a</i> |
| GO:0007067 <i>mitotic nuclear division</i> | 21 | 6,16E-14 | 9,520 | <i>Kif23, Cenpn, Setdb2, Kif11, Nek2, Sgol1, Cdc20, Aurka, Anln, Ndc80, Smc2, Ccnb1, Kif2c, Timeless, Ncapg2, Olp5, Spag5, Kif20b, Bub1, Mis18bp1, Mastl</i> |
| GO:0071346 <i>cellular response to interferon-gamma</i> | 5 | 0,002 | 9,233 | <i>Gbp7, Gbp9, Gbp4, Gbp3, Gbp2</i> |
| GO:0051301 <i>cell division</i> | 25 | 2,16E-15 | 8,394 | <i>Kif23, Nek2, Anln, Aurka, Mlt1, Kif2c, Cdc45, Ncapg2, Olp5, Bub1, Mastl, Setdb2, Kif11, Sgol1, Cdc20, Ndc80, Racgap1, Ect2, Smc2, Ccnb1, Sgol2a, Timeless, Spag5, Kif20b, Mis18bp1</i> |
| GO:0050830 <i>defense response to Gram-positive bacterium</i> | 5 | 0,006 | 6,751 | <i>Havcr2, Gbp7, Gbp9, Gbp3, Gbp2</i> |
| GO:0006952 <i>defense response</i> | 6 | 0,002 | 6,495 | <i>Gm12185, Irgm1, Irgm2, Igtf, Tgtp1, Tgtp2</i> |
| GO:0007049 <i>cell cycle</i> | 34 | 1,07E-18 | 6,953 | <i>Kif23, Nek2, Aurka, Anln, Mlt1, Kif2c, Cdc45, Olp5, Ncapg2, Bub1, Mastl, Ddla, Ckap2, Setdb2, Kif11, Dlgap5, Sgol1, Cdc20, Ndc80, Racgap1, Mcm3, Smc2, Ect2, Esco2, Trim21, Ccnb1, Sgol2a, Sasa5, Timeless, Spag5, Fancd2, Kif20b, Mis18bp1, Melk</i> |
| GO:0002244 <i>hematopoietic progenitor cell differentiation</i> | 5 | 0,008 | 6,407 | <i>Herc6, Anln, Samd9l, Esco2, Adar</i> |
| GO:0045087 <i>innate immune response</i> | 20 | 3,98E-10 | 6,278 | <i>Havcr2, Irgm1, Bst2, Herc6, Oas2, Trim21, Ddx58, Ifit3, Ifi202b, Ifit2, Ifit1, Mbt21d1, Oas1, Ir77, Oas1b, Igtf1, Oas1a, Eif2ak2, Mx1, Adar</i> |
| GO:0002376 <i>immune system process</i> | 17 | 6,36E-08 | 5,573 | <i>Havcr2, Irgm1, Bst2, Herc6, Oas2, Ddx58, Ifit3, Ifit2, Ifit1, Mbt21d1, Oas1, Ir77, Oas1b, Igtf1, Mx1, Eif2ak2, Adar</i> |
| GO:0002230 <i>positive regulation of defense response to virus by host</i> | 5 | 0,016 | 5,146 | <i>Ddx58, Slc1a3, Mbt21d1, Trim6, Stat2</i> |
| GO:0006974 <i>cellular response to DNA damage stimulus</i> | 9 | 0,019 | 2,690 | <i>Timeless, Parp9, Gen1, Fancd2, Dtl, Dtx3l, Parpbb, Mastl, Ddla</i> |

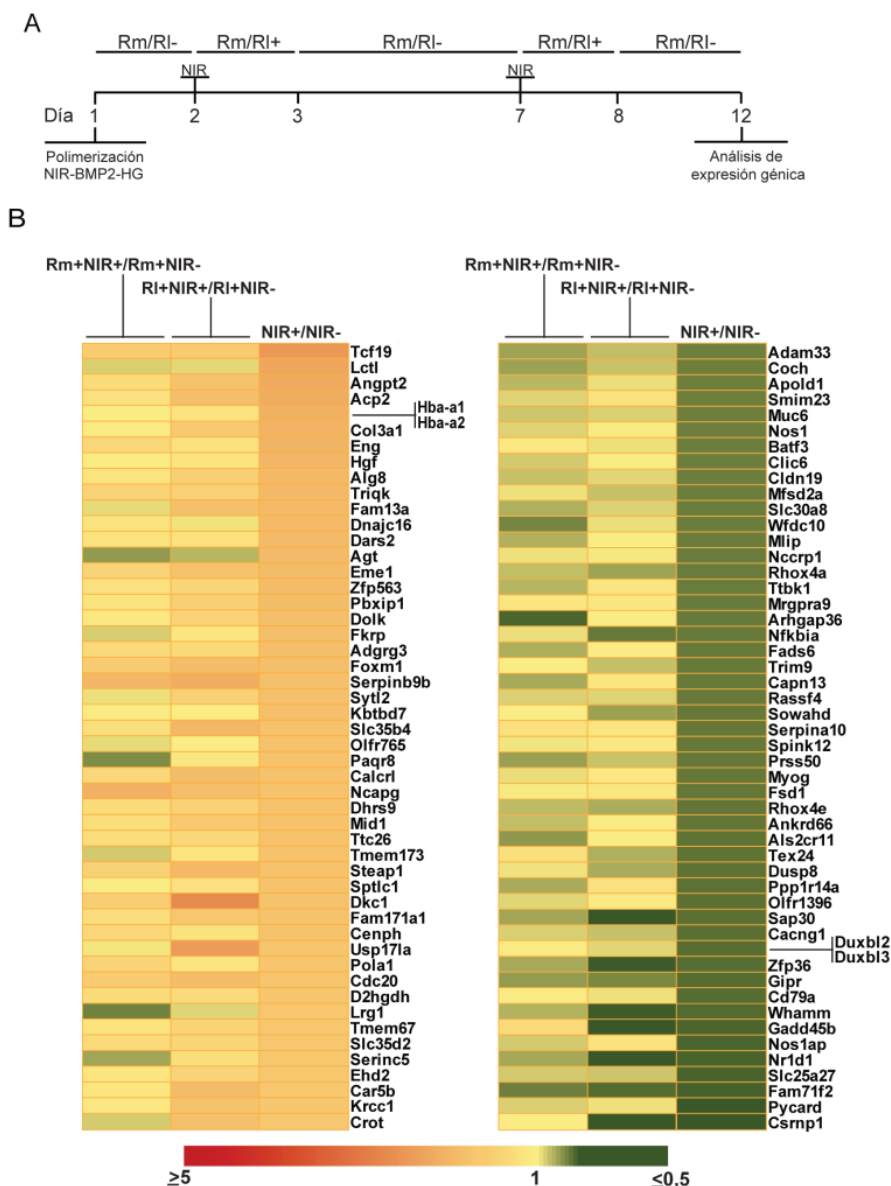


Figura 12. Análisis del transcriptoma de células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incorporadas en NIR-BMP-2-HG sometidos únicamente a irradiación NIR. (A) El esquema representa la cronología de la preparación de NIR-BMP-2-HG, irradiación NIR durante 10 min, cultivo en ausencia (Rm/RI-) o presencia (Rm/RI+) de rapamicina (Rm) o AP21967 (RI) y análisis de expresión génica. En los días 3 y 8, el medio se reemplazó por medio carente de dimerizador. (B) Mapas de calor que muestran los niveles relativos de expresión de los 50 genes más inducidos (izquierda) o reprimidos (derecha) en células que residen en NIR-BMP-2-HG irradiados en ausencia de dimerizador (tercera columna, NIR+) con respecto a los de células que residen en NIR-BMP-2-HG no tratados y no irradiados (NIR-). Las primeras y segundas columnas de cada mapa de calor muestran los niveles relativos de expresión de los genes correspondientes en células que residen en NIR-BMP-2-HG irradiados en presencia de Rm (primera columna, Rm+NIR+) o RI (segunda columna, RI+NIR+) con respecto a los de células que residen en NIR-BMP-2-HG no irradiados e incubados con el correspondiente dimerizador (Rm+NIR- y RI+NIR-, respectivamente).

Tabla 4. Análisis del transcriptoma en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en ausencia de dimerizadores. Se muestran los niveles relativos de ARNm de los genes que aumentan significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que se irradiaron en ausencia de dimerizador (NIR+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no tratados y no irradiados (NIR-). Se muestran los correspondientes valores relativos de ARNm de dichos genes en células que se irradiaron en presencia de rapamicina (NIR+Rm+) o AP21967 (NIR+RI+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no irradiados en presencia de estos mismos dimerizadores (NIR-Rm+ y NIR-RI+, respectivamente). Todos los demás detalles son como en la Tabla 1.

| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm+/NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Nº Acceso a GeneBank | Símbolo del gen |
|-----------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|--|
| TC1700001969. mm.2 | 1,56 | 0,055 | 1,584 | 0,026 | 2,440 | 2,24E-04 | NM_001163763 | <i>Tcf19</i> |
| TC0900000809. mm.2 | 0,91 | 0,704 | 0,930 | 0,564 | 2,192 | 0,002 | NM_145835 | <i>Lctf</i> |
| TC0800001797. mm.2 | 1,28 | 0,745 | 1,681 | 0,069 | 2,136 | 0,017 | NM_007426 | <i>Angpt2</i> |
| TC0200001371. mm.2 | 1,21 | 0,277 | 1,775 | 0,002 | 2,087 | 4,88E-04 | NM_007387 | <i>Acp2</i> |
| TC1100000339. mm.2 | 1,01 | 0,867 | 1,182 | 0,314 | 2,020 | 2,29E-04 | NM_008218 | <i>Hba-a1;</i> <i>Hba-a2</i> |
| TC0100000343. mm.2 | 1,04 | 0,946 | 1,602 | 0,170 | 1,982 | 0,0306 | NM_009930 | <i>Col3a1</i> |
| TC0200005472. mm.2 | 1,37 | 0,047 | 1,221 | 0,232 | 1,953 | 5,07E-04 | NM_001146348 | <i>Eng</i> |
| TC0500000125. mm.2 | 1,04 | 0,829 | 1,180 | 0,321 | 1,923 | 0,001 | NM_001289458 | <i>Hgf</i> |
| TC0700001348. mm.2 | 1,14 | 0,580 | 1,509 | 0,112 | 1,884 | 0,030 | NM_199035 | <i>Alg8</i> |
| TC0400000114. mm.2 | 1,42 | 0,023 | 1,493 | 0,010 | 1,869 | 2,85E-04 | NM_001171801 | <i>Triqk</i> |
| TC0600002381. mm.2 | 0,94 | 0,723 | 1,755 | 0,002 | 1,863 | 0,001 | NM_153574 | <i>Fam13a</i> |
| TC0400003892. mm.2 | 1,18 | 0,228 | 0,966 | 0,808 | 1,860 | 1,41E-04 | NM_172338 | <i>Dnajc16</i> |
| TC0100003371. mm.2 | 1,18 | 0,352 | 1,190 | 0,281 | 1,847 | 0,002 | NM_172644 | <i>Dars2</i> |
| TC0800003171. mm.2 | 0,73 | 0,093 | 0,822 | 0,342 | 1,844 | 0,009 | NM_007428 | <i>Agt</i> |
| TC1100003569. mm.2 | 1,42 | 0,206 | 1,682 | 0,110 | 1,829 | 0,038 | NM_177752 | <i>Eme1</i> |
| TC1700000573. mm.2 | 1,21 | 0,210 | 1,388 | 0,052 | 1,824 | 0,002 | NM_001024950 | <i>Zfp563</i> |
| TC0300000765. mm.2 | 1,18 | 0,445 | 1,505 | 0,108 | 1,793 | 0,031 | NM_146131 | <i>Pbxip1</i> |
| TC0200003267. mm.2 | 1,09 | 0,477 | 1,441 | 0,015 | 1,783 | 5,87E-04 | NM_177648 | <i>Dolk</i> |
| TC0700002437. mm.2 | 0,90 | 0,551 | 1,142 | 0,460 | 1,779 | 0,001 | NM_173430 | <i>Fkrp</i> |
| TC0800001127. mm.2 | 1,30 | 0,274 | 1,336 | 0,211 | 1,771 | 0,024 | NM_173036 | <i>Adgrg3</i> |
| TC0600001508. mm.2 | 1,55 | 0,051 | 1,805 | 0,008 | 1,758 | 0,015 | NM_008021 | <i>Foxm1;</i> <i>4933413</i> <i>G19Rik</i> |
| TC1300000365. mm.2 | 1,90 | 0,024 | 2,068 | 0,011 | 1,757 | 0,047 | NM_011452 | <i>Serpinb9</i> <i>b</i> |
| TC0700001280. mm.2 | 0,96 | 0,741 | 1,481 | 0,050 | 1,750 | 0,020 | NM_001040085 | <i>Sytl2</i> |
| TC1400001103. mm.2 | 1,05 | 0,735 | 1,030 | 0,816 | 1,737 | 0,003 | NM_001024135 | <i>Kbtbd7</i> |
| TC0600002044. mm.2 | 1,24 | 0,305 | 1,898 | 0,010 | 1,732 | 0,014 | NM_021435 | <i>Slc35b4</i> |
| TC1000003171. mm.2 | 0,94 | 0,654 | 1,029 | 0,886 | 1,730 | 0,002 | NM_001085477 | <i>Olfir765</i> |
| TC0100000129. mm.2 | 0,68 | 0,048 | 1,107 | 0,518 | 1,727 | 0,005 | NM_028829 | <i>Paqr8</i> |
| TC0200003865. mm.2 | 1,36 | 0,372 | 1,801 | 0,022 | 1,727 | 0,034 | NM_018782 | <i>Calcr1</i> |
| TC0500000494. mm.2 | 2,03 | 0,014 | 1,785 | 0,018 | 1,723 | 0,026 | NM_019438 | <i>Ncapg</i> |
| TC0200001006. mm.2 | 1,28 | 0,254 | 1,456 | 0,081 | 1,718 | 0,027 | NM_175512 | <i>Dhrs9</i> |
| TC0X00001710. mm.2 | 1,25 | 0,280 | 1,608 | 0,016 | 1,718 | 0,017 | NM_010797 | <i>Mid1</i> |
| TC0600000374. mm.2 | 1,26 | 0,067 | 1,345 | 0,023 | 1,717 | 2,87E-04 | NM_153600 | <i>Ttc26</i> |
| TC1800001181. mm.2 | 0,89 | 0,596 | 1,125 | 0,750 | 1,712 | 0,007 | NM_001289591 | <i>Tmem17</i> <i>3</i> |
| TC0500001914. mm.2 | 1,46 | 0,100 | 1,887 | 0,004 | 1,707 | 0,019 | NM_027399 | <i>Steap1</i> |
| TC1300002017. mm.2 | 1,01 | 0,812 | 1,221 | 0,194 | 1,703 | 0,002 | NM_009269 | <i>Sptlc1</i> |
| TC0X00000735. mm.2 | 1,54 | 0,002 | 2,655 | 0 | 1,692 | 3,48E-04 | NM_001030307 | <i>Dkc1</i> |

Resultados

| | | | | | | | | |
|------------------------|------|----------|-------|---------|-------|----------|------------------|-------------------|
| TC0200000002. mm.2 | 1,27 | 0,307 | 1,650 | 0,037 | 1,690 | 0,027 | NM_0010811 61 | Fam171 a1 |
| TC13000002542. mm.2 | 1,36 | 0,213 | 1,194 | 0,351 | 1,684 | 0,017 | NM_021886 | Cenph |
| TC0700001535. mm.2 | 0,98 | 0,870 | 2,394 | 2,7E-05 | 1,681 | 0,003 | NM_007887 | Usp17la |
| TC0X00002631. mm.2 | 1,42 | 0,010 | 1,125 | 0,300 | 1,680 | 4,47E-04 | NM_008892 | Pola1 |
| TC0400003390. mm.2 | 1,56 | 0,026 | 1,817 | 0,007 | 1,674 | 0,019 | NM_023223 | Cdc20 |
| TC0100000947. mm.2 | 1,28 | 0,081 | 1,304 | 0,0933 | 1,671 | 0,004 | NM_178882 | D2hgdh |
| TC1700002315. mm.2 | 0,64 | 0,049 | 0,924 | 0,610 | 1,656 | 0,043 | NM_029796 | Lrg1 |
| TC0400002220. mm.2 | 1,17 | 0,414 | 1,430 | 0,059 | 1,653 | 0,012 | NM_177861 | Tmem67 |
| TC1300002196. mm.2 | 1,30 | 0,159 | 1,386 | 0,038 | 1,650 | 0,005 | NM_0010013 21 | Slc35d2 |
| TC1300001036. mm.2 | 0,76 | 0,141 | 1,253 | 0,147 | 1,645 | 0,003 | NM_172588 | Serinc5 |
| TC0700002417. mm.2 | 1,12 | 0,571 | 1,415 | 0,106 | 1,642 | 0,014 | NM_153068 | Ehd2 |
| TC0X00003327. mm.2 | 1,13 | 0,590 | 1,833 | 0,018 | 1,640 | 0,034 | NM_181315 | Car5b |
| TC0600000822. mm.2 | 1,10 | 0,640 | 1,696 | 0,008 | 1,638 | 0,019 | NM_145568 | Krcc1; Mir8112 |
| TC0500001936. mm.2 | 0,90 | 0,782 | 1,752 | 0,003 | 1,636 | 0,007 | NM_023733 | Crot |
| TC1700001570. mm.2 | 1,34 | 0,190 | 1,362 | 0,108 | 1,633 | 0,012 | NM_177596 | Zfp947 |
| TC1800000191. mm.2 | 1,08 | 0,538 | 1,655 | 0,008 | 1,627 | 0,009 | NM_0011604 04 | Galnt1 |
| TC1400001914. mm.2 | 1,31 | 0,340 | 1,248 | 0,345 | 1,627 | 0,037 | NM_007554 | Bmp4 |
| TC1100000245. mm.2 | 1,44 | 0,009 | 1,643 | 0,001 | 1,620 | 0,002 | NM_0010336 54 | Pus10 |
| TC1300001960. mm.2 | 1,59 | 0,012 | 1,322 | 0,082 | 1,619 | 0,009 | NM_025495 | Cenpp |
| TC1500000034. mm.2 | 0,83 | 0,242 | 0,999 | 0,889 | 1,612 | 0,003 | NM_013485 | C9 |
| TC1600000788. mm.2 | 1,05 | 0,794 | 1,858 | 0,024 | 1,612 | 0,043 | NM_011173 | Pros1 |
| TC0900003334. mm.2 | 1,09 | 0,368 | 1,128 | 0,428 | 1,610 | 0,007 | NM_175324 | Acad11 |
| TC0700000795. mm.2 | 0,89 | 0,465 | 1,143 | 0,356 | 1,609 | 0,022 | NM_008456 | Klk1b5 |
| TC0100001502. mm.2 | 1,34 | 0,160 | 1,790 | 0,009 | 1,604 | 0,035 | NM_138314 | Nme7 |
| TC1300001764. mm.2 | 1,20 | 0,209 | 1,226 | 0,183 | 1,600 | 0,005 | NM_173051 | Serpinb1 c |
| TC1100003532. mm.2 | 1,27 | 0,115 | 1,702 | 0,001 | 1,598 | 0,004 | NM_011505 | Stxbp4 |
| TC0100002349. mm.2 | 1,18 | 0,310 | 1,489 | 0,036 | 1,597 | 0,019 | NM_0011633 14 | Pgap1 |
| TC0400001519. mm.2 | 1,12 | 0,421 | 1,369 | 0,052 | 1,596 | 0,006 | NM_025970 | Zbtb8os |
| TC1200000978. mm.2 | 1,20 | 0,261 | 1,565 | 0,011 | 1,594 | 0,012 | NM_029553 | Ttc8 |
| TC1100002579. mm.2 | 1,78 | 2,59E-04 | 2,208 | 6E-06 | 1,594 | 0,001 | NM_024475 | Ublcp1 |
| TC0200001312. mm.2 | 0,88 | 0,423 | 0,796 | 0,098 | 1,593 | 0,002 | NM_146640 | Olf1153 |
| TC0200000636. mm.2 | 1,19 | 0,279 | 1,459 | 0,015 | 1,593 | 0,003 | NM_0012063 67 | Gsn |
| TC1000001593. mm.2 | 1,56 | 0,045 | 2,403 | 5,60E-4 | 1,593 | 0,030 | NM_0011360 82 | Timeless |
| TC1400000772. mm.2 | 1,10 | 0,386 | 0,968 | 0,760 | 1,589 | 0,0002 | NM_153083 | Thtpa; Zfhx2os |
| TC1900000008. mm.2 | 0,98 | 0,983 | 1,140 | 0,509 | 1,586 | 0,019 | NM_013495 | Cpt1a |
| TC0100000295. mm.2 | 0,92 | 0,522 | 1,025 | 0,925 | 1,585 | 0,005 | NM_0011233 82 | Il1r1 |
| TC0300000580. mm.2 | 0,78 | 0,325 | 1,445 | 0,131 | 1,582 | 0,033 | NM_178726 | Ppm1l |
| TC0100003883. mm.2 | 1,08 | 0,549 | 1,111 | 0,513 | 1,581 | 0,004 | NM_178884 | Obsl1 |
| TC0700003590. mm.2 | 1,11 | 0,370 | 1,008 | 0,982 | 1,578 | 0,013 | NM_173445 | Rccd1 |
| TC0900001459. mm.2 | 1,12 | 0,478 | 1,586 | 0,010 | 1,573 | 0,013 | NM_0010011 44 | Scap |
| TC0300001802. mm.2 | 1,41 | 0,057 | 1,268 | 0,119 | 1,572 | 0,011 | NM_013531 | Gnb4 |
| TC0700000534. mm.2 | 1,08 | 0,683 | 1,351 | 0,061 | 1,568 | 0,012 | NM_013705 | Zfp30 |
| TC0X00002448. mm.2 | 1,23 | 0,110 | 1,327 | 0,041 | 1,567 | 0,002 | NM_0011721 54 | Dnase1l 1 |
| TC1000001204. mm.2 | 1,10 | 0,580 | 1,422 | 0,116 | 1,565 | 0,042 | NM_015737 | Galnt4 |
| TC1200001109. mm.2 | 1,26 | 0,254 | 1,299 | 0,164 | 1,564 | 0,023 | NM_0010433 35 | Eml1 |
| TC0900000370. mm.2 | 0,94 | 0,634 | 1,363 | 0,092 | 1,562 | 0,014 | NM_011734 | Siae |
| TC0X00002415. mm.2 | 1,35 | 0,045 | 1,314 | 0,091 | 1,561 | 0,011 | NM_019405 | Cetn2 |
| TC0400003599. mm.2 | 1,10 | 0,535 | 1,623 | 0,011 | 1,560 | 0,016 | NM_008228 | Hdac1 |

| | | | | | | | | |
|-----------------------|------|-------|-------|----------|-------|-------|------------------|---------------------------|
| TC0100002667. mm.2 | 0,99 | 0,956 | 1,112 | 0,521 | 1,558 | 0,027 | NM_010570 | <i>Irs1</i> |
| TC0100003301. mm.2 | 1 | 0,942 | 1,652 | 0,050 | 1,558 | 0,035 | NM_008209 | <i>Mr1</i> |
| TC0800002428. mm.2 | 0,94 | 0,832 | 1,248 | 0,151 | 1,555 | 0,006 | NM_0011646 79 | <i>Ano8</i> |
| TC0X00000708. mm.2 | 1,07 | 0,607 | 1,288 | 0,088 | 1,553 | 0,007 | NM_018794 | <i>Atp6ap1</i> |
| TC0200001889. mm.2 | 1,56 | 0,002 | 1,666 | 5,68E-04 | 1,551 | 0,003 | NM_175154 | <i>Galk2</i> |
| TC0900002870. mm.2 | 1,09 | 0,552 | 1,043 | 0,736 | 1,549 | 0,014 | NM_0010332 10 | <i>Pls1</i> |
| TC0200001751. mm.2 | 1,08 | 0,617 | 1,439 | 0,021 | 1,548 | 0,010 | NM_028117 | <i>Chst14</i> |
| TC1200000419. mm.2 | 1,47 | 0,032 | 1,453 | 0,042 | 1,548 | 0,028 | NM_021710 | <i>Ap4s1</i> |
| TC0X00001056. mm.2 | 1,29 | 0,097 | 0,932 | 0,564 | 1,547 | 0,008 | NM_053201 | <i>Magee1</i> |
| TC1000001913. mm.2 | 1,02 | 0,707 | 1,175 | 0,296 | 1,546 | 0,008 | NM_172787 | <i>L3mbtl3</i> |
| TC0X00002384. mm.2 | 0,93 | 0,605 | 1,006 | 0,989 | 1,545 | 0,017 | NM_010498 | <i>Ids</i> |
| TC1900000040. mm.2 | 1,03 | 0,903 | 1,708 | 0,011 | 1,545 | 0,028 | NM_0011629 46 | <i>Pcx</i> |
| TC0400000531. mm.2 | 1,04 | 0,794 | 1,430 | 0,021 | 1,544 | 0,015 | NM_0012819 77 | <i>Invs</i> |
| TC0300002328. mm.2 | 1,12 | 0,449 | 1,211 | 0,193 | 1,543 | 0,009 | NM_144898 | <i>Msto1</i> |
| TC1200000688. mm.2 | 1,08 | 0,556 | 1,591 | 0,021 | 1,543 | 0,024 | NM_0012526 14 | <i>Fut8</i> |
| TC0600001425. mm.2 | 0,96 | 0,750 | 1,352 | 0,090 | 1,543 | 0,029 | NM_145130 | <i>Lpcat3</i> |
| TC0500001522. mm.2 | 1,01 | 0,919 | 1,256 | 0,079 | 1,541 | 0,002 | NM_0011304 76 | <i>Tpst1</i> |
| TC0400001286. mm.2 | 1,48 | 0,031 | 1,597 | 0,009 | 1,540 | 0,021 | NM_0012858 12 | <i>Tmem53</i> |
| TC1600000952. mm.2 | 1,23 | 0,164 | 1,178 | 0,333 | 1,538 | 0,033 | NM_0011593 31 | <i>N6amt1</i> |
| TC1000002725. mm.2 | 0,98 | 0,812 | 1,210 | 0,410 | 1,537 | 0,045 | NM_0011686 55 | <i>Socs2</i> |
| TC1500002342. mm.2 | 1,38 | 0,024 | 1,434 | 0,027 | 1,536 | 0,007 | NM_0010424 38 | <i>Zhx1</i> |
| TC0700004638. mm.2 | 0,94 | 0,909 | 1,202 | 0,292 | 1,535 | 0,049 | NM_029391 | <i>Rab4b; Mir3101</i> |
| TC0400002942. mm.2 | 1,09 | 0,474 | 1,249 | 0,064 | 1,534 | 0,002 | NM_026647 | <i>Zdhc21</i> |
| TC1100000571. mm.2 | 1,30 | 0,114 | 0,980 | 0,951 | 1,530 | 0,013 | NM_028398 | <i>Phykp1</i> |
| TC1500002037. mm.2 | 1,34 | 0,126 | 1,324 | 0,113 | 1,529 | 0,027 | NM_199198 | <i>Hdac10</i> |
| TC0100000427. mm.2 | 1,23 | 0,253 | 1,455 | 0,016 | 1,529 | 0,008 | NM_009676 | <i>Aox1</i> |

Tabla 5. Análisis del transcriptoma en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en ausencia de dimerizadores. Se muestran los niveles relativos de ARNm de los genes que disminuyen significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que se irradiaron en ausencia de dimerizador (NIR+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no tratados y no irradiados (NIR-). Se muestran los correspondientes valores relativos de ARNm de dichos genes en células que se irradiaron en presencia de rapamicina (NIR+Rm+) o AP21967 (NIR+RI+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no irradiados en presencia de estos mismos dimerizadores (NIR-Rm+ y NIR-RI+, respectivamente). Todos los demás detalles son como en la Tabla 1.

| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm+/NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Nº Acceso a GeneBank | Símbolo del gen |
|-----------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| TC0700002705. mm.2 | 0,89 | 0,405 | 0,579 | 0,001 | 0,666 | 0,006 | NM_010908 | <i>Nfkbib</i> |
| TC0500000855. mm.2 | 1,19 | 0,182 | 1,097 | 0,523 | 0,665 | 0,003 | NM_053087 | <i>Ep gn</i> |
| TC1700001608. mm.2 | 0,99 | 0,954 | 0,991 | 0,979 | 0,665 | 0,007 | NM_027644 | <i>Prss41</i> |
| TC0700001517. mm.2 | 0,88 | 0,409 | 0,662 | 0,019 | 0,664 | 0,035 | NM_147056 | <i>Olfr646</i> |
| TC0900003344. mm.2 | 0,86 | 0,376 | 1,110 | 0,379 | 0,664 | 0,027 | NM_133977 | <i>Trf</i> |
| TC1600000522. mm.2 | 0,73 | 0,013 | 0,829 | 0,109 | 0,664 | 0,002 | NM_0012857 88 | <i>Ildr1</i> |
| TC1700001101. mm.2 | 0,97 | 0,794 | 0,985 | 0,835 | 0,663 | 0,001 | NM_0012066 61 | <i>Tmem200c</i> |

Resultados

| | | | | | | | | |
|-----------------------|------|-------|--------|----------|-------|----------|------------------|------------------------|
| TC0500002684. mm.2 | 1,22 | 0,051 | 1,071 | 0,503 | 0,663 | 5,35E-04 | NM_178730 | <i>Tmprss11f</i> |
| TC0400000395. mm.2 | 0,93 | 0,622 | 0,965 | 0,762 | 0,662 | 0,005 | uc008slm.1 | <i>Ccl19</i> |
| TC1500002151. mm.2 | 0,97 | 0,967 | 1,028 | 0,918 | 0,662 | 0,005 | NM_0011645 63 | <i>Amigo2</i> |
| TC1400001730. mm.2 | 0,93 | 0,639 | 0,967 | 0,721 | 0,662 | 0,003 | NM_0010390 71 | <i>Ldb3</i> |
| TC0600001754. mm.2 | 1,07 | 0,590 | 0,976 | 0,781 | 0,662 | 0,003 | NR_003634 | <i>Rps4l</i> |
| TC0X00002136. mm.2 | 1 | 0,905 | 0,966 | 0,724 | 0,661 | 0,010 | NM_0011907 18 | <i>Dcaf12l1</i> |
| TC0100001190. mm.2 | 1,29 | 0,209 | 0,996 | 0,892 | 0,661 | 0,028 | NM_0011950 25 | <i>Nuak2</i> |
| TC1300000090. mm.2 | 0,79 | 0,161 | 0,867 | 0,282 | 0,661 | 0,013 | NM_010317 | <i>Gng4</i> |
| TC0900002720. mm.2 | 0,87 | 0,458 | 0,879 | 0,452 | 0,660 | 0,022 | NM_025274 | <i>Dppa5a</i> |
| TC0100001734. mm.2 | 0,78 | 0,051 | 0,922 | 0,536 | 0,660 | 0,002 | NM_0011602 11 | <i>Cnih3</i> |
| TC1500001737. mm.2 | 0,81 | 0,195 | 0,968 | 0,963 | 0,659 | 0,011 | NM_0011356 88 | <i>Ly6h</i> |
| TC1100000701. mm.2 | 0,95 | 0,791 | 1,006 | 0,920 | 0,659 | 0,011 | NM_146538 | <i>Olfir315</i> |
| TC1000002535. mm.2 | 0,91 | 0,583 | 0,932 | 0,578 | 0,658 | 0,004 | NM_0012820 95 | <i>Tjp3</i> |
| TC0700001510. mm.2 | 0,97 | 0,797 | 0,898 | 0,467 | 0,658 | 0,005 | NM_147119 | <i>Olfir632</i> |
| TC0200000429. mm.2 | 0,70 | 0,059 | 0,914 | 0,611 | 0,657 | 0,032 | NM_0012764 48 | <i>Lcn6</i> |
| TC1300000469. mm.2 | 0,90 | 0,666 | 0,640 | 0,015 | 0,656 | 0,019 | NM_0011635 72 | <i>Tmem170b</i> |
| TC0500003043. mm.2 | 0,96 | 0,872 | 1,099 | 0,626 | 0,656 | 0,027 | NM_008153 | <i>Cmklr1</i> |
| TC1700001018. mm.2 | 0,95 | 0,674 | 0,785 | 0,060 | 0,655 | 0,001 | NM_0011956 73 | <i>Prr22</i> |
| TC1800000322. mm.2 | 0,96 | 0,844 | 0,7449 | 0,109 | 0,655 | 0,020 | NM_0012896 02 | <i>Psd2</i> |
| TC1100001928. mm.2 | 0,91 | 0,885 | 0,857 | 0,640 | 0,653 | 0,042 | NM_010254 | <i>Galr2</i> |
| TC1100003046. mm.2 | 1,01 | 0,933 | 0,968 | 0,766 | 0,653 | 0,002 | NM_007911 | <i>Galr2 Efnb3</i> |
| TC0700004655. mm.2 | 1,24 | 0,304 | 0,808 | 0,170 | 0,652 | 0,033 | NM_0010425 27 | <i>Blm</i> |
| TC0200001448. mm.2 | 0,78 | 0,088 | 0,970 | 0,779 | 0,652 | 0,006 | NM_0010252 46 | <i>Trp53i11</i> |
| TC1000002269. mm.2 | 0,78 | 0,184 | 1,038 | 0,777 | 0,651 | 0,037 | NM_0012538 57 | <i>Tet1</i> |
| TC0400002509. mm.2 | 1,12 | 0,618 | 1,123 | 0,519 | 0,649 | 0,016 | NM_0012771 67 | <i>Fam205a1</i> |
| TC0300000871. mm.2 | 0,89 | 0,276 | 0,910 | 0,370 | 0,649 | 6,22E-04 | NM_0012896 13 | <i>Celf3</i> |
| TC1800000112. mm.2 | 0,76 | 0,095 | 0,867 | 0,372 | 0,648 | 0,011 | NM_153087 | <i>Hrh4</i> |
| TC1200001460. mm.2 | 0,97 | 0,795 | 0,610 | 0,008 | 0,647 | 0,014 | NM_0011304 12 | <i>Lpin1</i> |
| TC0100001589. mm.2 | 0,73 | 0,008 | 1,196 | 0,127 | 0,647 | 8,98E-04 | NM_0011226 80 | <i>Pvrl4</i> |
| TC0400003311. mm.2 | 0,90 | 0,409 | 1,117 | 0,366 | 0,646 | 0,001 | NM_0010039 47 | <i>Cyp4x1</i> |
| TC0700004425. mm.2 | 0,98 | 0,990 | 0,821 | 0,206 | 0,646 | 0,011 | NM_028654 | <i>Tex36</i> |
| TC0600002641. mm.2 | 0,73 | 0,090 | 0,494 | 9,62E-04 | 0,646 | 0,037 | NM_010751 | <i>Mxd1</i> |
| TC0500003013. mm.2 | 0,74 | 0,023 | 1,215 | 0,138 | 0,645 | 0,002 | NM_021351 | <i>Cryba4</i> |
| TC1300001430. mm.2 | 1,01 | 0,954 | 1,076 | 0,628 | 0,645 | 0,020 | NM_033269 | <i>Chrm3</i> |
| TC1500000869. mm.2 | 0,97 | 0,648 | 0,689 | 0,05 | 0,645 | 0,030 | NM_182928 | <i>Adm2</i> |
| TC0100000883. mm.2 | 0,90 | 0,308 | 0,886 | 0,241 | 0,645 | 3,17E-04 | NM_0011016 47 | <i>Prhl</i> |
| TC0700002718. mm.2 | 0,76 | 0,056 | 0,736 | 0,032 | 0,645 | 0,007 | NM_0010335 25 | <i>Kcnk6</i> |
| TC1100002833. mm.2 | 0,88 | 0,329 | 1,089 | 0,504 | 0,645 | 0,002 | NM_0010117 69 | <i>Olfir317</i> |
| TC1100002843. mm.2 | 0,89 | 0,322 | 0,955 | 0,808 | 0,644 | 0,002 | NM_080454 | <i>Gjc2</i> |
| TC0700002715. mm.2 | 0,88 | 0,303 | 0,981 | 0,994 | 0,643 | 0,002 | NM_182927 | <i>Spred3</i> |
| TC1600001168. mm.2 | 1,02 | 0,873 | 0,947 | 0,653 | 0,643 | 0,010 | NM_029070 | <i>Tmem114</i> |
| TC0700002769. mm.2 | 0,87 | 0,374 | 0,959 | 0,693 | 0,643 | 0,003 | NM_021397 | <i>Zbtb32</i> |
| TC1100000498. mm.2 | 0,88 | 0,351 | 0,812 | 0,095 | 0,642 | 0,002 | NM_146276 | <i>Olfir1394</i> |
| TC1700000923. mm.2 | 0,77 | 0,026 | 0,926 | 0,588 | 0,642 | 8,48E-04 | NM_025973 | <i>Pgc</i> |
| TC0200002511. mm.2 | 1,03 | 0,807 | 0,995 | 0,963 | 0,641 | 0,004 | NM_013679 | <i>Svs6</i> |
| TC0400000909. mm.2 | 0,83 | 0,292 | 0,866 | 0,446 | 0,641 | 0,006 | NM_010502 | <i>Ifna1</i> |

| | | | | | | | | |
|------------------------|-------|----------|-------|-------|-------|--------------|------------------|---------------------------------------|
| TC0X00001178. mm.2 | 0,95 | 0,631 | 0,851 | 0,327 | 0,640 | 0,007 | NM_0012718 09 | <i>Pcdh11x</i> |
| TC1000000679. mm.2 | 1,03 | 0,824 | 0,840 | 0,157 | 0,639 | 9,38E-04 | NM_0011437 76 | <i>Fam13c</i> |
| TC0900000385. mm.2 | 0,77 | 0,092 | 0,760 | 0,069 | 0,639 | 0,004 | NM_146424 | <i>Olfr888</i> |
| TC0800000209. mm.2 | 1,08 | 0,517 | 0,906 | 0,483 | 0,639 | 0,003 | NM_0010391 19 | <i>Defb33</i> |
| TC1900001097. mm.2 | 0,83 | 0,068 | 0,930 | 0,466 | 0,637 | 2,34E-04 | NM_0010334 81 | <i>Myrf</i> |
| TC0700000592. mm.2 | 0,83 | 0,093 | 0,988 | 0,844 | 0,637 | 6,24E-04 | NM_0012705 42 | <i>Scgb1b7</i> |
| TC0400000425. mm.2 | 0,96 | 0,786 | 0,896 | 0,432 | 0,637 | 0,003 | NM_172690 | <i>Phf24</i> |
| TC1400000251. mm.2 | 0,92 | 0,619 | 0,844 | 0,242 | 0,636 | 0,008 | NM_0011775 38 | <i>Duxbl2; Duxbl3; Duxbl1</i> |
| TC1300002097. mm.2 | 0,99 | 0,981 | 1,049 | 0,566 | 0,636 | 0,001 | NM_175214 | <i>Kif27; Mir6369</i> |
| TC1900000183. mm.2 | 1,08 | 0,514 | 0,955 | 0,677 | 0,636 | 0,003 | NM_010239 | <i>Fth1</i> |
| TC0200000466. mm.2 | 0,76 | 0,045 | 0,851 | 0,161 | 0,635 | 0,003 | NM_0011635 29 | <i>Adam33</i> |
| TC1200000418. mm.2 | 0,75 | 0,027 | 0,864 | 0,209 | 0,634 | 0,001 | NM_0011988 35 | <i>Coch</i> |
| TC0600001600. mm.2 | 0,83 | 0,135 | 0,955 | 0,713 | 0,634 | 0,002 | NM_0011099 14 | <i>Apold1</i> |
| TC1100002480. mm.2 | 0,92 | 0,497 | 1,198 | 0,312 | 0,633 | 0,005 | NM_027050 | <i>Smim23</i> |
| TC07000004547. mm.2 | 0,88 | 0,337 | 0,910 | 0,561 | 0,633 | 0,003 | NM_181729 | <i>Muc6</i> |
| TC0500001301. mm.2 | 0,92 | 0,468 | 0,992 | 0,926 | 0,631 | 7,19E-04 | NM_008712 | <i>Nos1</i> |
| TC0100001837. mm.2 | 1,09 | 0,485 | 0,958 | 0,725 | 0,630 | 0,001 | NM_030060 | <i>Batf3</i> |
| TC1600001029. mm.2 | 0,89 | 0,393 | 0,997 | 0,972 | 0,630 | 0,001 | NM_172469 | <i>Clic6</i> |
| TC0400001330. mm.2 | 0,86 | 0,200 | 0,928 | 0,481 | 0,630 | 6,93E-04 | NM_0010385 90 | <i>Cldn19</i> |
| TC0400003475. mm.2 | 0,96 | 0,710 | 0,860 | 0,166 | 0,630 | 9,3E-04 | NM_029662 | <i>Mfsd2a</i> |
| TC1500000375. mm.2 | 0,80 | 0,089 | 0,913 | 2,595 | 0,626 | 0,002 | NM_172816 | <i>Slc30a8</i> |
| TC0200002526. mm.2 | 0,66 | 0,002 | 0,953 | 0,733 | 0,626 | 8,8E-04 | NM_0010395 01 | <i>Wfdc10</i> |
| TC0900002698. mm.2 | 0,80 | 0,188 | 1,002 | 0,906 | 0,625 | 0,007 | NM_027150 | <i>Mlip</i> |
| TC0700002700. mm.2 | 0,96 | 0,678 | 0,984 | 0,820 | 0,625 | 9,21E-04 | NM_0010811 15 | <i>Nccrp1</i> |
| TC0X00000340. mm.2 | 0,85 | 0,201 | 0,757 | 0,031 | 0,625 | 0,001 | NM_0010396 88 | <i>Rhox4a</i> |
| TC1700002177. mm.2 | 0,81 | 0,176 | 1,136 | 0,379 | 0,623 | 0,005 | NM_0011628 64 | <i>Ttbk1</i> |
| TC0700003054. mm.2 | 1,15 | 0,362 | 1,118 | 0,510 | 0,621 | 0,009 | NM_0012888 01 | <i>Mrgpra9</i> |
| TC0X00000443. mm.2 | 0,55 | 1,26E-04 | 1,018 | 0,923 | 0,620 | 0,002 | NM_0010811 23 | <i>Arhgap36</i> |
| TC1200001768. mm.2 | 0,96 | 0,755 | 0,617 | 0,008 | 0,619 | 0,008 | NM_010907 | <i>Nfkbia</i> |
| TC11000004064. mm.2 | 0,79 | 0,124 | 1,024 | 0,984 | 0,618 | 0,008 | NM_178035 | <i>Fads6</i> |
| TC1200001886. mm.2 | 1,01 | 0,920 | 0,856 | 0,230 | 0,618 | 4,35E-04 | NM_0011102 02 | <i>Trim9</i> |
| TC1700002519. mm.2 | 0,78 | 0,130 | 1,136 | 0,376 | 0,618 | 0,003 | NM_0010334 44 | <i>Capn13</i> |
| TC0600002978. mm.2 | 0,91 | 0,534 | 0,919 | 0,607 | 0,614 | 0,018 | NM_178045 | <i>Rassf4</i> |
| TC0X00000332. mm.2 | 1,02 | 0,882 | 0,752 | 0,110 | 0,613 | 0,002 | NM_173779 | <i>Sowahd</i> |
| TC1200002271. mm.2 | 1,19 | 0,276 | 1,151 | 0,331 | 0,612 | 0,006 | NM_144834 | <i>Serpina10</i> |
| TC1800000451. mm.2 | 0,97 | 0,806 | 1,096 | 0,476 | 0,612 | 0,004 | NM_030061 | <i>Spink12</i> |
| TC0900001474. mm.2 | 0,74 | 0,026 | 0,863 | 0,250 | 0,611 | 9,26E-04 | NM_146227 | <i>Prss50</i> |
| TC0100001225. mm.2 | 0,95 | 0,779 | 1,087 | 0,508 | 0,611 | 0,00073 6 | NM_031189 | <i>Myog</i> |
| TC1700000995. mm.2 | 0,99 | 0,979 | 1,105 | 0,431 | 0,609 | 0,00467 9 | NM_183178 | <i>Fsd1</i> |
| TC0X00003390. mm.2 | 0,84 | 0,159 | 0,787 | 0,056 | 0,606 | 0,00047 1 | NM_201236 | <i>Rhox4e</i> |
| TC1700002128. mm.2 | 0,85 | 0,231 | 0,996 | 0,977 | 0,604 | 0,00107 5 | NM_0012549 53 | <i>Ankrd66</i> |
| TC0100002393. mm.2 | 0,722 | 0,105 | 0,998 | 0,927 | 0,598 | 0,02003 3 | uc007bdb.1 | <i>Als2cr11</i> |
| TC0800000357. mm.2 | 1,23 | 0,088 | 0,795 | 0,096 | 0,596 | 0,00040 3 | NM_0010136 09 | <i>Tex24</i> |
| TC07000004553. mm.2 | 0,97 | 0,9200 | 0,785 | 0,322 | 0,594 | 0,02171 3 | NM_008748 | <i>Dusp8</i> |
| TC0700000527. mm.2 | 0,78 | 0,126 | 1,208 | 0,258 | 0,591 | 0,00337 1 | NM_026731 | <i>Ppp1r14a</i> |

| | | | | | | | | |
|-----------------------|------|-------|-------|----------|-------|--------------|------------------------|---------------------------|
| TC1100002653. mm.2 | 0,93 | 0,576 | 1,062 | 0,655 | 0,588 | 0,00067 9 | NM_146337 | <i>Olf1396</i> |
| TC0800002252. mm.2 | 0,77 | 0,261 | 0,466 | 9,13E-04 | 0,586 | 0,02770 8 | NM_021788 | <i>Sap30</i> |
| TC1100003961. mm.2 | 0,91 | 0,553 | 0,861 | 0,319 | 0,583 | 0,00108 5 | NM_007582 | <i>Cacng1</i> |
| TC1400000254. mm.2 | 1,04 | 0,844 | 0,926 | 0,497 | 0,579 | 0,00155 8 | OTTMUST00 000096955 | <i>Duxbl2; Duxbl3</i> |
| TC1400000256. mm.2 | 1,04 | 0,844 | 0,926 | 0,497 | 0,579 | 0,00155 8 | OTTMUST00 000096961 | <i>Duxbl3</i> |
| TC0700002696. mm.2 | 0,78 | 0,293 | 0,510 | 0,008 | 0,578 | 0,02069 6 | NM_011756 | <i>Zfp36</i> |
| TC0700002472. mm.2 | 0,73 | 0,116 | 0,663 | 0,045 | 0,575 | 0,00680 8 | NM_0010808 15 | <i>Gipr</i> |
| TC0700000402. mm.2 | 1 | 0,979 | 0,961 | 0,697 | 0,573 | 0,00143 2 | NM_007655 | <i>Cd79a</i> |
| TC0700001174. mm.2 | 0,81 | 0,374 | 0,515 | 0,007 | 0,565 | 0,03111 2 | NM_0010041 85 | <i>Whamm</i> |
| TC1000000877. mm.2 | 1,31 | 0,238 | 0,444 | 0,001 | 0,550 | 0,00779 8 | NM_008655 | <i>Gadd45b</i> |
| TC0100003887. mm.2 | 0,89 | 0,504 | 1,191 | 0,265 | 0,546 | 0,00035 1 | NM_0011099 85 | <i>Nos1ap</i> |
| TC1100003688. mm.2 | 0,77 | 0,447 | 0,464 | 0,005 | 0,540 | 0,03987 1 | NM_145434 | <i>Nr1d1</i> |
| TC1700002132. mm.2 | 0,89 | 0,384 | 0,875 | 0,291 | 0,540 | 0,00020 4 | NM_028711 | <i>Slc25a27</i> |
| TC0600000227. mm.2 | 0,63 | 0,025 | 0,569 | 0,011 | 0,533 | 0,00799 6 | NM_0011014 86 | <i>Fam71f2</i> |
| TC0700004351. mm.2 | 0,91 | 0,438 | 0,962 | 0,709 | 0,500 | 0,00002 1 | NM_023258 | <i>Pycard</i> |
| TC0900003250. mm.2 | 1,02 | 0,912 | 0,317 | 4,75E-04 | 0,478 | 0,02907 5 | NM_153287 | <i>Csmp1</i> |

Tabla 6. Análisis ontogénico de los genes cuya expresión se induce en células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} incluidas en NIR-BMP-2-HG que fueron irradiados en ausencia de dimerizadores. El análisis incluyó los genes cuyos niveles relativos de ARNm aumentan (rojo) o disminuyen (verde) significativamente al menos 1,5 veces en células incluidas en hidrogeles que fueron irradiados en ausencia de dimerizadores, con respecto a células incluidas hidrogeles no irradiados. Se muestran los términos, número de genes, valor p, grado de enriquecimiento y símbolo de los genes.

| Término | Nº de genes | Valor p | Grado de enriquecimiento | Genes |
|--|-------------|---------|--------------------------|--|
| GO:0014068 <i>positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling</i> | 4 | 0,012 | 8,371 | <i>Hcls1, Agt, Hgf, Fshr</i> |
| GO:0042384 <i>cilium assembly</i> | 6 | 0,003 | 6,230 | <i>Tmem67, Wdr19, Ttc26, Ttc8, Arl6, Wdr35</i> |
| GO:0060271 <i>cilium morphogenesis</i> | 7 | 0,002 | 5,515 | <i>Tmem67, Wdr19, Gsn, Ttc26, Ttc8, Arl6, Wdr35</i> |
| GO:0030030 <i>cell projection organization</i> | 6 | 0,005 | 5,322 | <i>Tmem67, Wdr19, Gsn, Ttc8, Arl6, Wdr35</i> |
| GO:0007568 <i>aging</i> | 5 | 0,040 | 3,871 | <i>Gsn, Agt, Col3a1, Foxo4, Scap</i> |
| GO:0007507 <i>heart development</i> | 6 | 0,045 | 3,079 | <i>Bmp4, Tmem67, Ap1b1, Col3a1, Calcdl, Eng</i> |
| GO:0007186 <i>G-protein coupled receptor signaling pathway</i> | 15 | 0,046 | 1,730 | <i>Olf1396, Cmklr1, Olf1315, Olf1888, Ccl19, Olf1394, Chrm3, Olf1646, Olf1632, Gipr, Hrhl4, Galr2, Olf1317, Gng4, Prlh</i> |

Tabla 7. Estudio mediante RT-qPCR de los cambios en la expresión de genes identificados como diferencialmente regulados mediante *microarrays*. Se muestran los niveles relativos de ARNm de 14 genes detectados como diferencialmente regulados mediante análisis RT-qPCR o de *microarrays* en células incluidas en hidrogeles que fueron irradiados en presencia de rapamicina (NIR+Rm+), AP21967 (NIR+RI+) o en ausencia de dimerizadores (NIR+) con respecto a los de células incluidas en hidrogeles no irradiados en presencia (NIR-Rm+ y NIR-RI+, respectivamente) o en ausencia (NIR-) de estos mismos dimerizadores. Todos los demás detalles son como en la Tabla 1.

| Cambios en la expresión de génica. Análisis mediante ensayos de RT-qPCR | | | | | | | |
|---|---|----------------------------|--|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------|
| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm/ NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/ NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Símbolo del gen |
| Mm00487796_m1 | 17,711 | 0,049 | 11,756 | 0,002 | 1,398 | 0,072 | <i>Mx1</i> |
| Mm01705338_s1 | 19,578 | 0,026 | 8,138 | 0,045 | 1,138 | 0,056 | <i>Isg15</i> |
| Mm07295796_m1 | 71,832 | 0,023 | 10,119 | 3E-04 | 0,630 | 0,103 | <i>Ifit1</i> |
| Mm01341950_m1 | 6,782 | 0,032 | 6,874 | 0,031 | 1,774 | 0,092 | <i>Herc6</i> |
| Mm01245815_m1 | 7,080 | 0,026 | 4,177 | 0,022 | 1,106 | 0,579 | <i>Xaf1</i> |
| Mm01257286_m1 | 3,653 | 0,037 | 4,107 | 0,010 | 1,428 | 0,187 | <i>Stat1</i> |
| Mm00492679_m1 | 3,321 | 0,037 | 3,014 | 0,030 | 1,303 | 0,128 | <i>Irf9</i> |
| Mm00490880_m1 | 2,120 | 0,023 | 2,239 | 0,014 | 1,373 | 0,131 | <i>Stat2</i> |
| Mm00435712_m1 | 0,454 | 1E-04 | 0,563 | 0,002 | 0,780 | 0,091 | <i>Pim1</i> |
| Mm00447364_m1 | 2,059 | 0,035 | 2,190 | 0,012 | 1,354 | 0,279 | <i>Trim21</i> |
| Mm00728630_s1 | 2,152 | 0,008 | 3,641 | 0,020 | 1,979 | 0,094 | <i>Klf2c</i> |
| Mm00460961_m1 | 13,182 | 0,039 | 11,702 | 0,030 | 1,311 | 0,194 | <i>Oas2</i> |
| Mm01609165_g1 | 3,150 | 0,038 | 5,163 | 0,018 | 1,177 | 0,434 | <i>Bst2</i> |
| Mm00518778_m1 | 2,398 | 0,043 | 2,710 | 0,019 | 1,430 | 0,148 | <i>Parp9</i> |
| Cambios en la expresión génica. Análisis mediante estudios con <i>microarrays</i> | | | | | | | |
| Nº de identificación | Niveles relativos de ARNm NIR+Rm/ NIR-Rm+ | Valor p NIR+Rm+ vs NIR-Rm+ | Niveles relativos de ARNm NIR+RI+/ NIR-RI+ | Valor p NIR+RI+ vs NIR-RI+ | Niveles relativos de ARNm NIR+/NIR- | Valor p NIR+ vs NIR- | Símbolo del gen |
| TC1600002148.mm.2 | 1,979 | 0,041 | 5,843 | 1E-04 | 1,029 | 0,839 | <i>Mx1</i> |
| TC0400004171.mm.2 | 6,089 | 5E-04 | 9,166 | 2E-04 | 0,892 | 0,804 | <i>Isg15</i> |
| TC1900000504.mm.2 | 13,015 | 1E-04 | 12,334 | 9E-04 | 0,465 | 0,191 | <i>Ifit1</i> |
| TC0600003503.mm.2 | 3,250 | 0,002 | 5,710 | 8E-04 | 0,970 | 0,739 | <i>Herc6</i> |
| TC1100000989.mm.2 | 3,763 | 0,001 | 4,624 | 0,003 | 0,946 | 0,884 | <i>Xaf1</i> |
| TC0100000375.mm.2 | 3,043 | 0,004 | 4,531 | 8 E-04 | 1,052 | 0,775 | <i>Stat1</i> |
| TC1400002834.mm.2 | 2,266 | 0,002 | 2,660 | 0,001 | 1,020 | 0,922 | <i>Irf9</i> |
| TC1000001596.mm.2 | 2,029 | 0,004 | 2,333 | 0,002 | 0,965 | 0,938 | <i>Stat2</i> |
| TC1700000505.mm.2 | 0,511 | 3E-04 | 0,511 | 2E-04 | 0,705 | 0,025 | <i>Pim1</i> |
| TC0700003862.mm.2 | 2,288 | 0,0021 | 2,019 | 0,019 | 1,223 | 0,425 | <i>Trim21</i> |
| TC0400003366.mm.2 | 2,031 | 0,037 | 2,292 | 0,023 | 1,639 | 0,116 | <i>Klf2c</i> |
| TC0500003175.mm.2 | 1,853 | 0,039 | 4,142 | 8E-04 | 0,884 | 0,771 | <i>Oas2</i> |
| TC0800002431.mm.2 | 2,037 | 0,017 | 2,695 | 0,012 | 1,045 | 0,890 | <i>Bst2</i> |
| TC1600000500.mm.2 | 2,438 | 9E-04 | 2,534 | 5E-04 | 1,187 | 0,450 | <i>Parp9</i> |

Las conclusiones que se obtuvieron a partir de los experimentos con *microarrays* se corroboraron analizando la expresión de un numero representativo de genes mediante ensayos de retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa (RT-qPCR) (Tabla 7). En concreto, se analizaron los niveles de expresión de 12 genes positivamente regulados (*Mx1*, *Isg15*, *Ifit1*, *Herc6*, *Xaf1*, *Stat1*, *Trim21*, *Oas2*, *Bst2* y *Parp9*) y de 1 gen negativamente regulado (*Pim1*) en células que sobreexpresan BMP-2, así como de un gen positivamente regulado a consecuencia de la irradiación NIR (*Klf2c*). Los resultados arrojaron

datos cualitativamente similares a los obtenidos mediante estudios con microarrays.

Una vez detectada la potente actividad autocrina de la BMP-2 secretada por las células contenidas en NIR-BMP-2-HG activados, se procedió a evaluar su actividad paracrina. Para ello, empleamos células C3H/10T1/2 cultivadas en micromasa que se trataron con medios condicionados por NIR-BMP-2-HG activados. En primer lugar, se determinó la influencia del tratamiento con dimerizadores sobre la diferenciación condrogénica inducida por rBMP-2 del cultivo en micromasa. Uno y seis días después de sembrar las células en micromasa, el medio de cultivo se reemplazó con medio conteniendo rBMP-2 y rapamicina o AP21967 (Fig. 13). Como controles, se dispusieron cultivos que no fueron tratados, o que únicamente recibieron rBMP-2 o dimerizador. Al cabo de 11 días tras la siembra, se determinó el grado de diferenciación condrogénica mediante tinción con azul alcian.

La tinción de la matriz extracelular de los cultivos tratados con rBMP-2 a concentraciones entre 1 y 100 ng mL⁻¹ fue más intensa que la de cultivos sin tratar, indicando que el factor de crecimiento recombinante estimula la diferenciación condrogénica. La intensidad de la tinción incrementó al aumentar las dosis del factor de crecimiento recombinante (Fig. 13B). La rapamicina, inhibidor específico de mTOR, inhibe significativamente la proliferación y diferenciación *in vitro* de células preosteoblásticas y de células estromales primarias de la médula ósea murina, a concentraciones tan bajas como 0,1 nM (Singha y col., 2008). Con el fin de evaluar la posible interferencia en la diferenciación condrogénica inducida por rBMP-2 de la dosis de rapamicina utilizada para activar condicionalmente la producción de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG, los cultivos en micromasa se expusieron a las mismas concentraciones de rBMP-2 en presencia de rapamicina 10 nM (Fig. 13B).

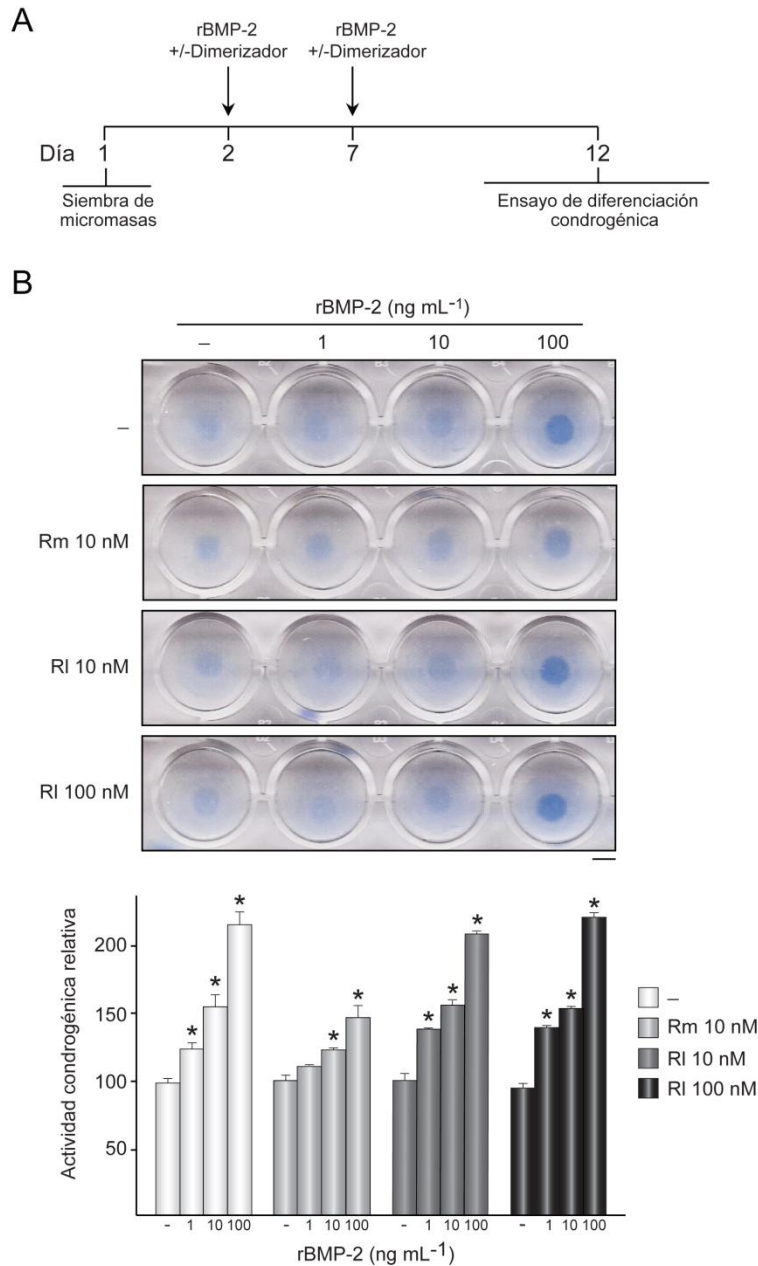


Figura 13. Efecto de los dimerizadores en la diferenciación condrogénica inducida por rBMP-2. (A) El esquema representa la cronología de la siembra de cultivos de células C3H/10T1/2 en micromasa, tratamientos con rBMP-2 en presencia (+) o ausencia (-) de dimerizador, y ensayo de diferenciación condrogénica. (B) Fotografías de cultivos tratados con las dosis indicadas de rBMP-2 y/o rapamicina (Rm) o AP21967 (RI), teñidos con azul alcian. El histograma muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de la tinción de azul alcian. Los datos son relativos a los valores correspondientes a cultivos no tratados, a los que se les dio el valor arbitrario de 100. *: $p < 0,05$ comparado con cultivos no tratados. Barra de escala: 5 mm.

La tinción con azul alcian fue menos intensa en las micromasas expuestas a rBMP2 en presencia que en ausencia de rapamicina. De hecho, no se observó ninguna diferencia entre el grado de tinción de cultivos tratados con 1 ng mL⁻¹ de rBMP-2 en presencia de rapamicina y el de cultivos no tratados. Se realizaron experimentos similares en los que las células fueron expuestas a rBMP-2 en presencia o en ausencia de AP21967 10 o 100 nM. Las micromasas tratadas con rBMP-2 en presencia de AP21967 mostraron niveles de tinción de azul alcian similares a los de cultivos que únicamente recibieron el factor de crecimiento, tanto cuando AP21967 se aplicó a concentración 10 nM como cuando se utilizó a concentración 10 veces mayor (Fig. 13B).

A continuación, y con el fin de determinar si la BMP-2 secretada en respuesta al tratamiento inductor de NIR-BMP-2-HG presenta actividad paracrina, se realizaron cocultivos de células C3H/10T1/2 sembradas en micromasa e hidrogeles activados mediante irradiación NIR en presencia de dimerizador (Fig. 14A). Dado que los experimentos mostrados anteriormente indicaban que la rapamicina influye negativamente en la diferenciación condrogénica inducida por rBMP-2 de las células C3H/10T1/2, estos experimentos se realizaron utilizando AP21967 100 nM como agente dimerizador. Como control se emplearon células cultivadas en micromasa que fueron tratadas con rBMP-2 a 10 ng mL⁻¹ y AP21967 100 nM. Las intensidades de la tinción de azul alcian de las micromasas cocultivadas con NIR-BMP-2-HG inducidos mediante irradiación NIR en presencia de AP21967 100 nM fueron significativamente mayores que las de micromasas expuestas a rBMP-2 10 ng mL⁻¹ y AP21967 100 nM (Fig. 14B). No se observaron diferencias entre las intensidades de la tinción con azul alcian de micromasas cocultivadas con hidrogeles que no fueron tratados, o que únicamente fueron tratados con AP21967 o únicamente irradiados (Fig. 14B). Estos datos muestran que la BMP-2 secretada por NIR-BMP-2-HG irradiados en presencia de AP21967 presenta actividad paracrina, promoviendo la diferenciación condrogénica de células con las que no establecen contacto directo alguno.

Es importante señalar que tras una ronda de activación la concentración de BMP-2 secretada por los hidrogeles alcanza concentraciones de unos $0,7 \text{ ng mL}^{-1}$ (Fig. 9), dando lugar a un efecto superior sobre la diferenciación condrogénica de células C3H/10T1/2 que el alcanzado por una concentración de 10 ng mL^{-1} de rBMP-2.

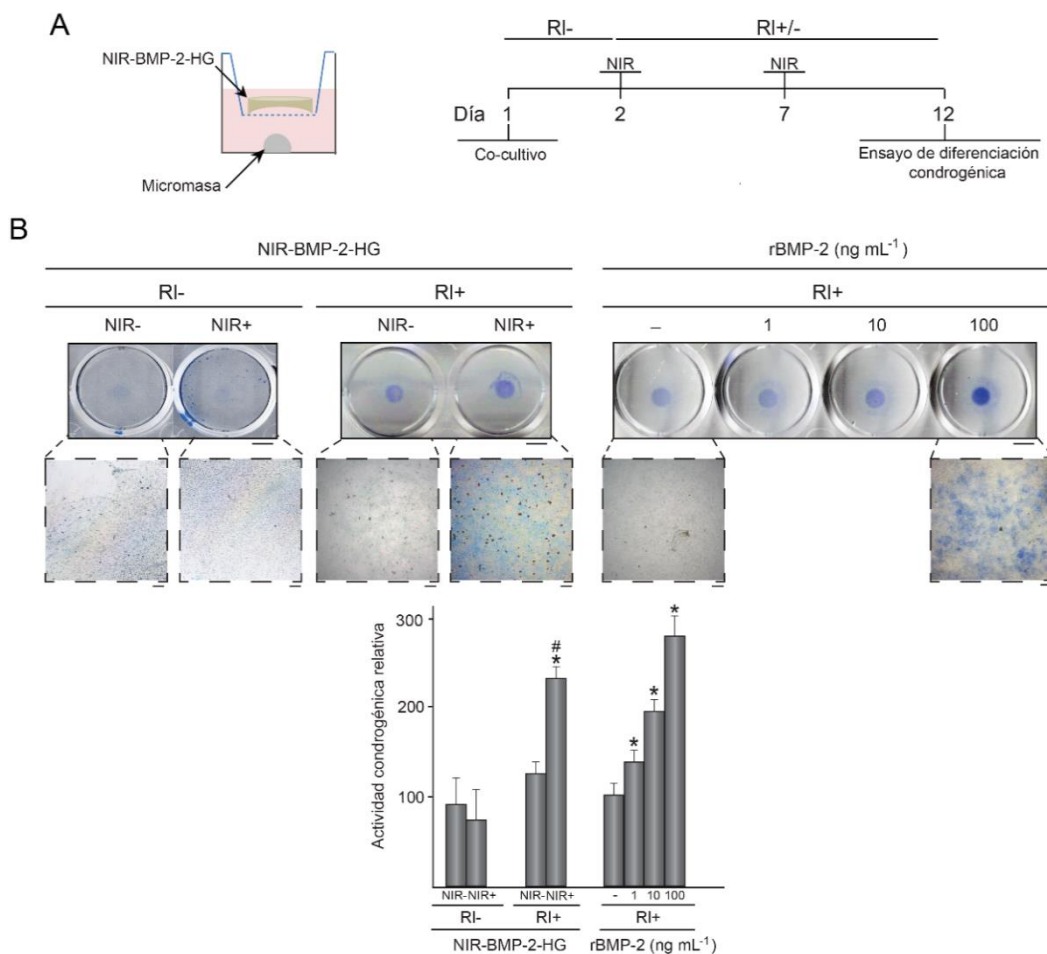


Figura 14. Bioactividad de BMP-2 inducida por NIR-BMP-2-HG. (A) Representación esquemática (izquierda) y cronología (derecha) del cocultivo de micromasas C3H/10T1/2 y NIR-BMP-2-HG en presencia (RI+) o ausencia (RI-) de AP21967 100 nM, irradiación NIR durante 10 min y ensayo de diferenciación condrogénica. (B) Izquierda: fotografías y micrografías de micromasas, teñidas de azul alcán, que se cocultivaron con NIR-BMP-2-HG irradiados (NIR+) o no (NIR-) en presencia (RI+) o ausencia (RI-) de AP21967. Derecha: fotografías y micrografías de las micromasas, teñidas de azul alcán, que se trataron con AP21967 100 nM (RI+) y las dosis indicadas de rBMP-2. El histograma muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de la tinción de azul alcán de las micromasas. Los datos son relativos a los valores correspondientes a cultivos tratados únicamente con 100 nM AP21967, a los que se les dio un valor arbitrario de 100, $n = 3$. *: $p < 0,05$ comparado con cultivos tratados únicamente con AP21967 100 nM. #: $p < 0,05$ comparado con cultivos tratados con AP21967 100 nM y rBMP-2 10 ng mL^{-1} . Barras de escala: 5 mm (fotografías), 100 μm (micrografías).

1.6 Inducción de la expresión transgénica en lesiones óseas

Con el fin de evaluar la capacidad de NIR-HG-BMP-2 para regular la secreción de BMP-2, contribuyendo a la regeneración del tejido óseo dañado, se puso a punto un modelo de defecto óseo en calvaria de ratón. Para ello, se realizó una incisión coronal de 3 cm en el cuero cabelludo a nivel occipital, exponiendo la bóveda craneal, y se creó un defecto de tamaño crítico de 4 mm de diámetro en el hueso parietal izquierdo. La osteotomía se llevó a cabo mediante microcirugía empleando una fresa dental acoplada a un micromotor, para evitar daño en la duramadre y minimizar la erosión del periostio que rodea la lesión ósea (Fig. 15A). Tras cerrar la incisión coronal con una sutura reabsorbible, se implantaron en el defecto óseo los precursores de los hidrogeles fototérmicos mediante inyección subcutánea, polimerizando *in situ* (Fig. 15B). Los hidrogeles incluyeron células C3H/10T1/2-fLuc, que expresan fLuc bajo el control del circuito génico activable por calor y dependiente de dimerizador (Martin-Saavedra y col., 2013).

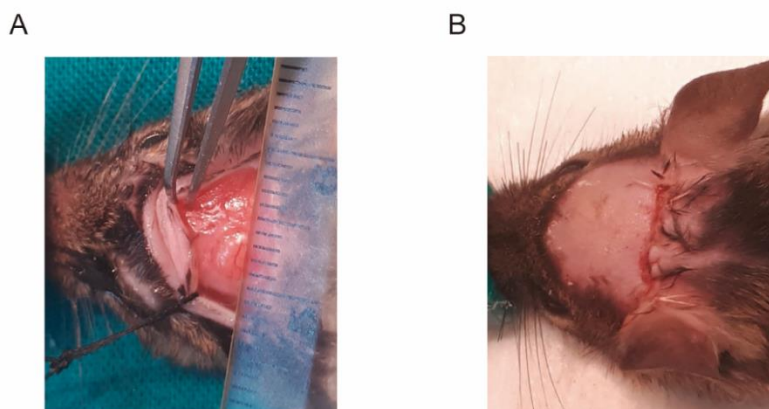


Figura 15. Microcirugía en calvaria de ratón e implantación. (A) La fotografía ilustra la realización de una incisión coronal de 3 cm en el cuero cabelludo a nivel occipital, exponiendo la bóveda craneal, y el defecto óseo de 4 mm. (B) La fotografía muestra la zona implantada tras la polimerización del implante.

Un día después de realizar la cirugía, se administró rapamicina por vía intraperitoneal y 90 min más tarde se irradió la zona implantada durante 10 min con un láser NIR. Este mismo tratamiento inductor se repitió ocho días después de la implantación (Fig. 16A). Para minimizar el riesgo de quemaduras en la piel, la potencia del láser se ajustó a $11\text{-}17 \text{ mW mm}^{-2}$, lo que permitió incrementar la temperatura de la superficie irradiada, de $34,53 \pm 0,74 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en el momento de

iniciar la irradiación, en $12,38 \pm 0,62$ y $12,17 \pm 0,73$ °C, tras las irradiaciones efectuadas uno y ocho días, respectivamente, después de la implantación (Fig. 16B, gráfico derecha).

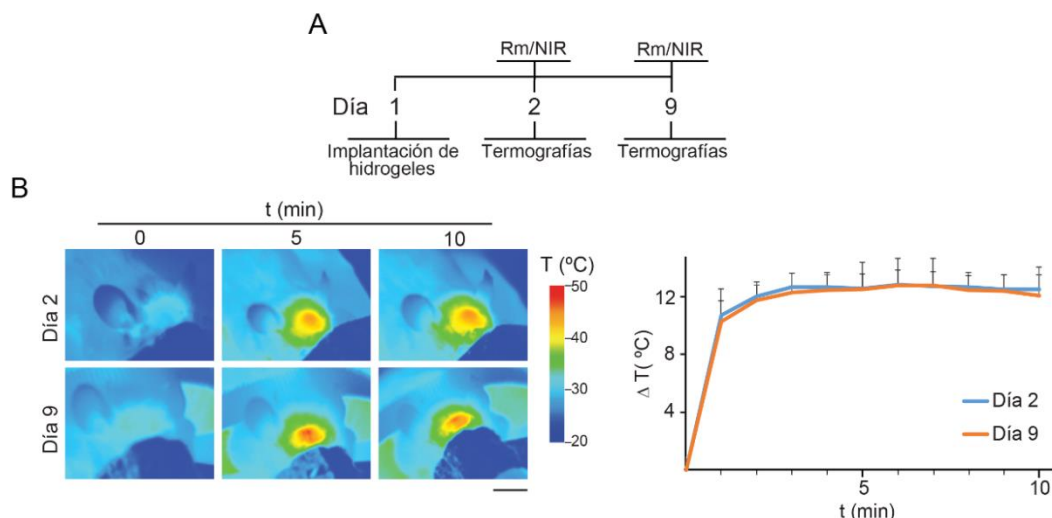


Figura 16. Actividad fototérmica de NIR-fLuc-HG implantados en lesiones óseas. (A) El esquema representa la cronología de la implantación de NIR-fLuc-HG en un defecto óseo de tamaño crítico en la calvaria de ratón, administración de rapamicina (Rm) e irradiación (NIR) de la región implantada durante 10 min y realización de termografías. (B) Termografías IR de animales implantados con NIR-fLuc-HG durante la irradiación NIR a los tiempos indicados. El gráfico muestra los valores promedio + DE de los incrementos de la temperatura máxima detectados en las zonas irradiadas, n = 5. Barra de escala: 1 cm.

Un día después de la irradiación en presencia de rapamicina, se inyectó D-luciferina en el área del defecto (Fig. 17). Las imágenes de bioluminiscencia obtenidas tras la primera y segunda ronda de activación revelaron una fuerte inducción de la actividad enzimática en las zonas de implantación (Fig. 17B, panel izquierdo). No se detectaron diferencias significativas entre los niveles de actividad inducidos después de la primera y segunda ronda de irradiación NIR (Fig. 17B, histograma derecho). Además, no se detectaron niveles de actividad significativos del gen testigo en los implantes no irradiados de animales tratados con rapamicina, que se emplearon como control. Estos resultados demuestran que es factible controlar en un defecto óseo la expresión transgénica inducible por calor y dependiente de dimerizador mediante la irradiación NIR de intermediarios tisulares basados en matrices de fibrina que contienen HGPN.

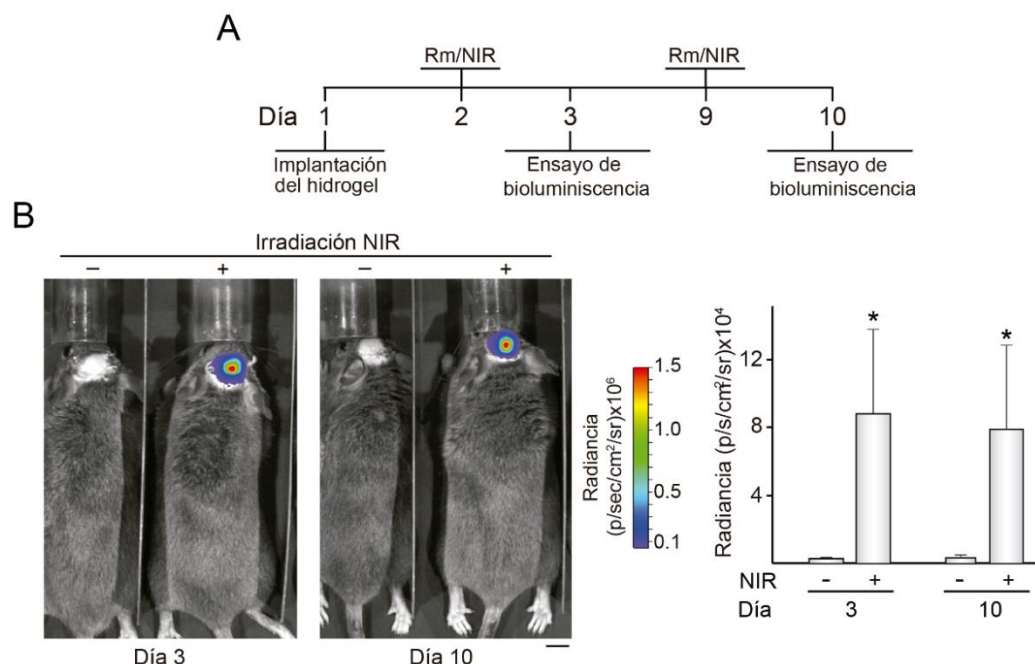


Figura 17. Expresión transgénica inducida por activación de NIR-fLuc-HG implantados en lesiones óseas. (A) El esquema representa la cronología de la implantación de NIR-fLuc-HG, administración de rapamicina (Rm) e irradiación (NIR) durante 10 min de la región implantada y ensayos de bioluminiscencia. (B) Imágenes de bioluminiscencia de animales implantados con NIR-fLuc-HG a los que se administró Rm y se expuso (+) o no (-) a irradiación NIR. El histograma muestra el promedio de los niveles de radiancia de la luminiscencia detectados en el lugar de implantación, $n = 5$. Barra de escala: 1 cm.

1.7 Secreción de BMP-2 inducida en lesiones óseas tras activación de NIR-BMP-2-HG

A continuación, quisimos determinar si era posible inducir la secreción de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG implantados en defectos óseos. Se incluyeron células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} en los precursores de hidrogeles fototérmicos que se implantaron, tal y como se describió en el caso de NIR-fLuc-HG, en las lesiones generadas en la calvaria de los ratones (Fig. 18A). Uno y ocho días después, los animales implantados fueron tratados con rapamicina y expuestos a irradiación NIR, lo que aumentó la temperatura de la piel que cubría el implante en $12,36 \pm 0,32$ °C y $12,32 \pm 0,37$ °C, respectivamente (Fig. 18B). La figura 18C ilustra un NIR-BMP-2-HG implantado en el defecto óseo, un día después de una primera ronda de activación. En la imagen se aprecia la línea media del hueso de la cabeza (rojo) y a ambos lados el hidrogel de fibrina (morado) en el que se

aprecian las células C3H/10T1/2-BMP-2^{High}. Un día después de cada irradiación NIR se recuperaron los implantes, con los que se prepararon extractos que se emplearon para cuantificar su contenido en BMP-2. Se observó que la producción del factor de crecimiento era muy superior en las muestras de implantes irradiados, en comparación con las procedentes de implantes no irradiados. Los resultados indicaron asimismo que, al igual que lo observado en los experimentos *in vitro*, la primera ronda de activación supera a la segunda en cuanto a la capacidad de inducción del factor de crecimiento (Fig. 18D).

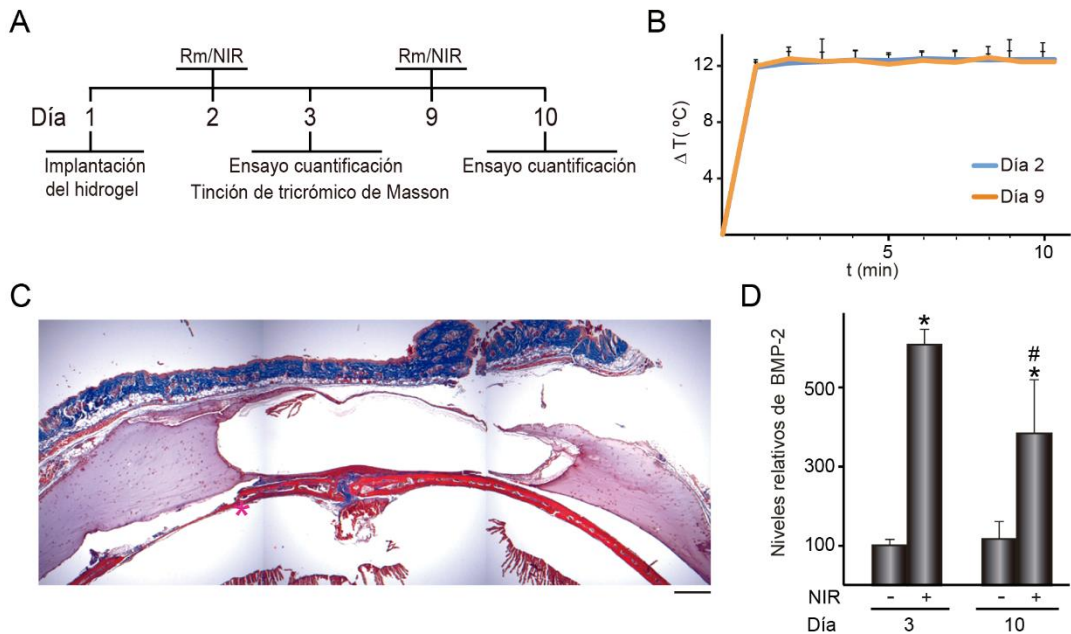


Figura 18. Producción de BMP-2 inducida por activación de NIR-BMP-2-HG implantados en lesiones óseas. (A) El esquema representa la cronología de la implantación subcutánea de NIR-BMP-2-HG, administración de rapamicina (Rm) e irradiación (NIR) durante 10 min de la región implantada, tinción de tricrómico de Masson y cuantificación de BMP-2. (B) El gráfico muestra la media + DE de los incrementos de la temperatura máxima detectados en los animales irradiados a los tiempos indicados, $n = 5$. (C) Tinción de tricrómico de Masson de un corte histológico transversal del defecto óseo de tamaño crítico y su implante, un día después de la primera ronda de activación. El hueso mineralizado se tiñe en rojo, el hidrogel en morado y el colágeno en azul. Los asteriscos marcan las posiciones de los márgenes originales del defecto óseo. Barra de escala: 250 μ m. (D) Niveles de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG procedentes de ratones tratados con Rm y que se expusieron (+) o no (-) a irradiación NIR. Los datos son relativos a los valores de BMP-2 detectados en implantes no irradiados en el día 3 ($0,16 \pm 0,03$ pg de BMP-2 por mg de implante recuperado) a los que se les dio un valor arbitrario de 100, $n = 4$. *: $p < 0,05$ comparado con animales no irradiados. #: $p < 0,05$ comparado con muestras irradiadas que fueron analizadas en el día 3.

1.8 Regeneración ósea tras activación de NIR-BMP-2-HG

A continuación, quisimos determinar si la inducción de BMP-2 en NIR-BMP-2-HG activados podría contribuir a la regeneración del defecto óseo generado en calvaria de ratón. Para ello, se implantaron los hidrogeles tal y como se ha descrito y los animales se trataron con rapamicina y se sometieron a irradiación NIR al cabo de 1 y 8 días. Durante las diez semanas posteriores a la implantación, se monitorizaron posibles efectos adversos sobre la salud de los animales (Fig. 19). Los animales se pesaron una vez por semana, no observándose diferencias significativas entre los valores promedio del peso de los animales que se irradiaron o no (Fig. 19A). Además, se observó que la implantación de los hidrogeles no genera alteraciones visibles en la piel (Fig. 19B, imagen de la semana 1). Únicamente algunos de ellos mostraron en las semanas 2 y 3 alguna herida superficial debido al rascado de la zona (Fig. 19B, imágenes de las semanas 2 y 3), que cicatrizó ulteriormente.

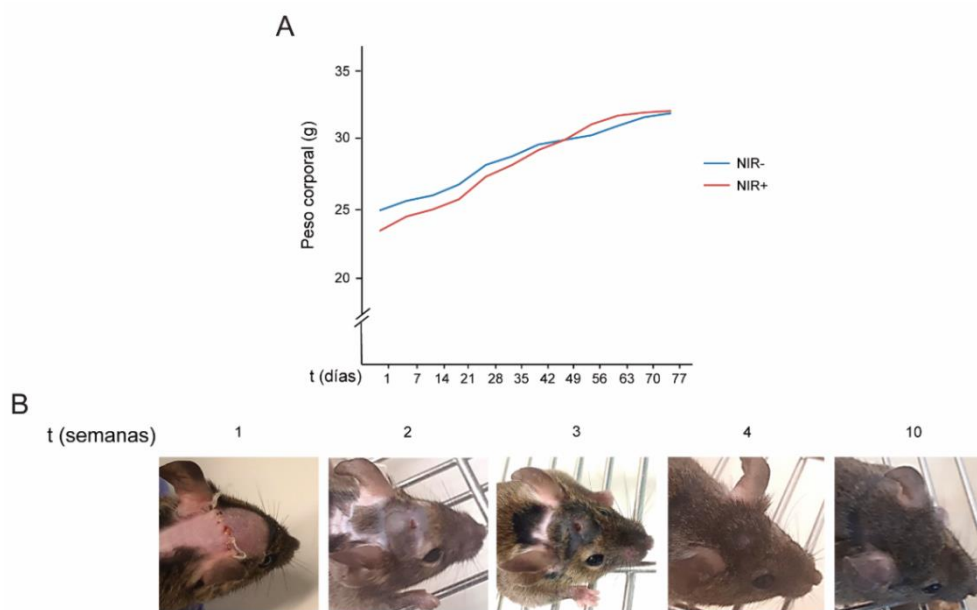


Figura 19. Evolución del peso corporal y lesiones de la piel en ratones implantados con NIR-BMP-2-HG. (A) Valores promedio del peso corporal de ratones implantados durante 75 días con NIR-BMP-2-HG que, 1 y 8 días tras la implantación, fueron tratados con rapamicina e irradiados (NIR+) o no (NIR-). (B) Imágenes de la cabeza de ratones implantados que fueron sometidos a irradiación NIR. Barra de escala: 0,5 cm.

Diez semanas después de la implantación, se tomaron imágenes de rayos X de animales irradiados y no irradiados (Fig. 20A). En los implantes de animales que fueron irradiados se apreciaron zonas de atenuación de rayos X, que se correspondieron con pequeños islotes de osificación, disminuyendo el diámetro de los defectos óseos en 1 mm (Fig. 20B).

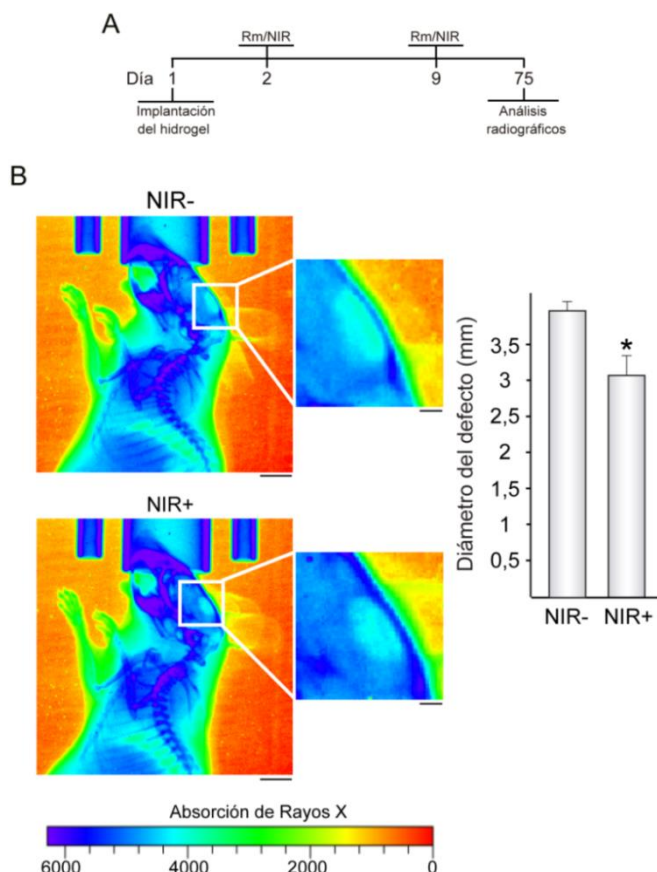


Figura 20. Radiografías de animales implantados con NIR-BMP-2-HG. (A) El esquema representa la cronología de la implantación de NIR-BMP-2-HG, administración de rapamicina (Rm) e irradiación NIR (NIR) y análisis radiográfico. (B) Imágenes de rayos X de animales implantados a los que se les administró Rm y se expusieron (NIR+) o no (NIR-) a irradiación NIR. El histograma muestra el diámetro medio de las áreas radiolucientes en los defectos óseos implantados con NIR-BMP-2-HG, que se expusieron o no a irradiación NIR, $n = 5$. *: $p < 0,05$ comparado con animales no irradiados. Barras de escala: 5 mm (1 mm para las ampliaciones).

Una vez tomadas las imágenes radiográficas, los animales fueron sacrificados, analizándose el grado de regeneración de los defectos óseos mediante análisis histológico. En los animales que no se irradiaron la tinción con tricrómico de Masson reveló que, el defecto óseo presenta una fina capa de tejido fibrótico, principalmente compuesto por colágeno que se tiñe de color azul. Sin embargo,

en los animales irradiados se observa una gruesa capa de tejido, que alterna zonas fibróticas teñidas de color azul con áreas de mineralización teñidas en rojo, entre los engrosados bordes mineralizados de la osteotomía que se tiñen en rojo. Asimismo, en los animales irradiados se observó un prominente panículo adiposo en la zona de la hipodermis que cubre el implante. No se detectaron vestigios de los hidrogeles inyectados en ninguna de las muestras, irradiadas o no. El análisis histomorfométrico confirmó la formación de hueso nuevo en los animales irradiados.

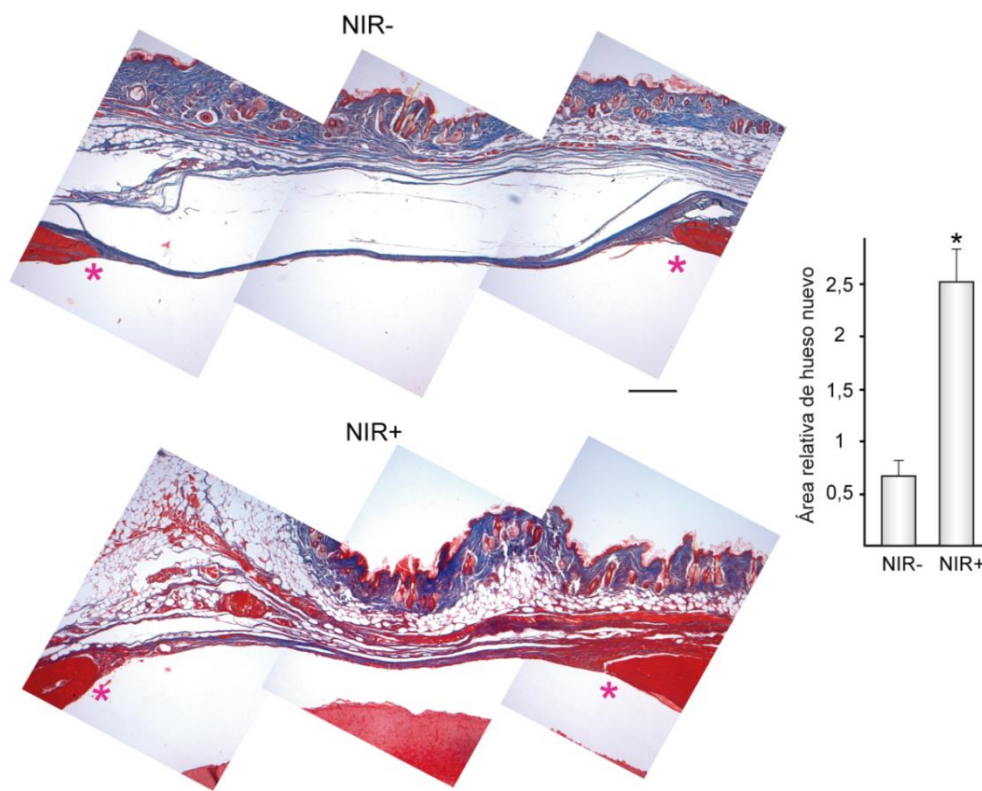


Figura 21. Regeneración ósea inducida por activación de NIR-BMP-2-HG. Tinción de tricrómico de Masson de cortes histológicos de defectos óseos implantados. Los asteriscos marcan las posiciones de los márgenes originales de los defectos óseos. El histograma muestra la cuantificación histomorfométrica del hueso formado en el defecto óseo. $n = 5$. *: $p < 0,05$ comparado con los animales no irradiados. Barras de escala: 250 μm .

Para descartar que la elevación de temperatura, consecuencia de la irradiación NIR, promueva la regeneración del defecto óseo, se implantaron hidrogeles carentes de células, que contenían o no HGNP, en los defectos creados en el hueso de la calvaria. Uno y ocho días después de la inyección de hidrogeles, los animales implantados se irradiaron como se ha descrito

anteriormente. Durante las diez semanas posteriores a la implantación, no se observaron diferencias significativas entre los valores promedio del peso de los animales que se implantaron con hidrogeles careciendo o conteniendo HGNP, ni tampoco entre los que se irradiaron o no (Fig. 22).

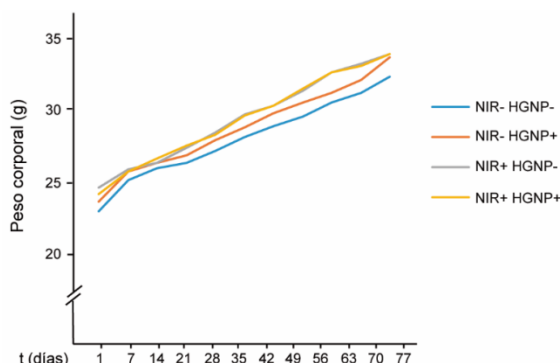


Figura 22. Evolución del peso corporal de ratones implantados con hidrogeles carentes de células. La gráfica muestra los valores promedio del peso corporal de ratones implantados durante 75 días con hidrogeles conformados con HGNP (HGNP+) o sin ellas (HGNP-) y que 1 y 8 días tras la implantación se irradiaron (NIR+) o no (NIR-).

Durante la primera y segunda ronda de irradiación (Fig. 23A), los animales implantados con hidrogeles carentes de HGNP incrementaron la temperatura de la piel que cubre el implante en $4,95 \pm 0,15$ °C y $4,33 \pm 1,08$ °C, respectivamente (Fig. 23B). Este aumento se debió probablemente a la absorción de la luz NIR incidente por estructuras como los folículos pilosos pigmentados. Los incrementos térmicos provocados por la irradiación de implantes que incluyen HGNP fueron similares a los observados en implantes que contenían células C3H/10T1/2-BMP-2^{High} o C3H/10T1/2-fLuc (Fig. 23B). El análisis histológico de los hidrogeles carentes de células, realizado 10 semanas después de la implantación, sólo mostró tejido fibroso uniendo los bordes de osteotomía de los defectos implantados con hidrogeles conformados o no HGNP, tanto irradiados como no irradiados, sin ningún signo de regeneración ósea (Fig. 23C, paneles superiores). La cuantificación histomorfométrica de las secciones histológicas confirmó la falta de formación de nuevo hueso (Fig. 23C, histograma). No se observaron diferencias significativas entre el grado de regeneración ósea de ratones implantados con hidrogeles fototérmicos que carecían de células, irradiados o no, y el de ratones implantados con NIR-BMP-2-HG a los que se les administró rapamicina, pero no fueron irradiados.

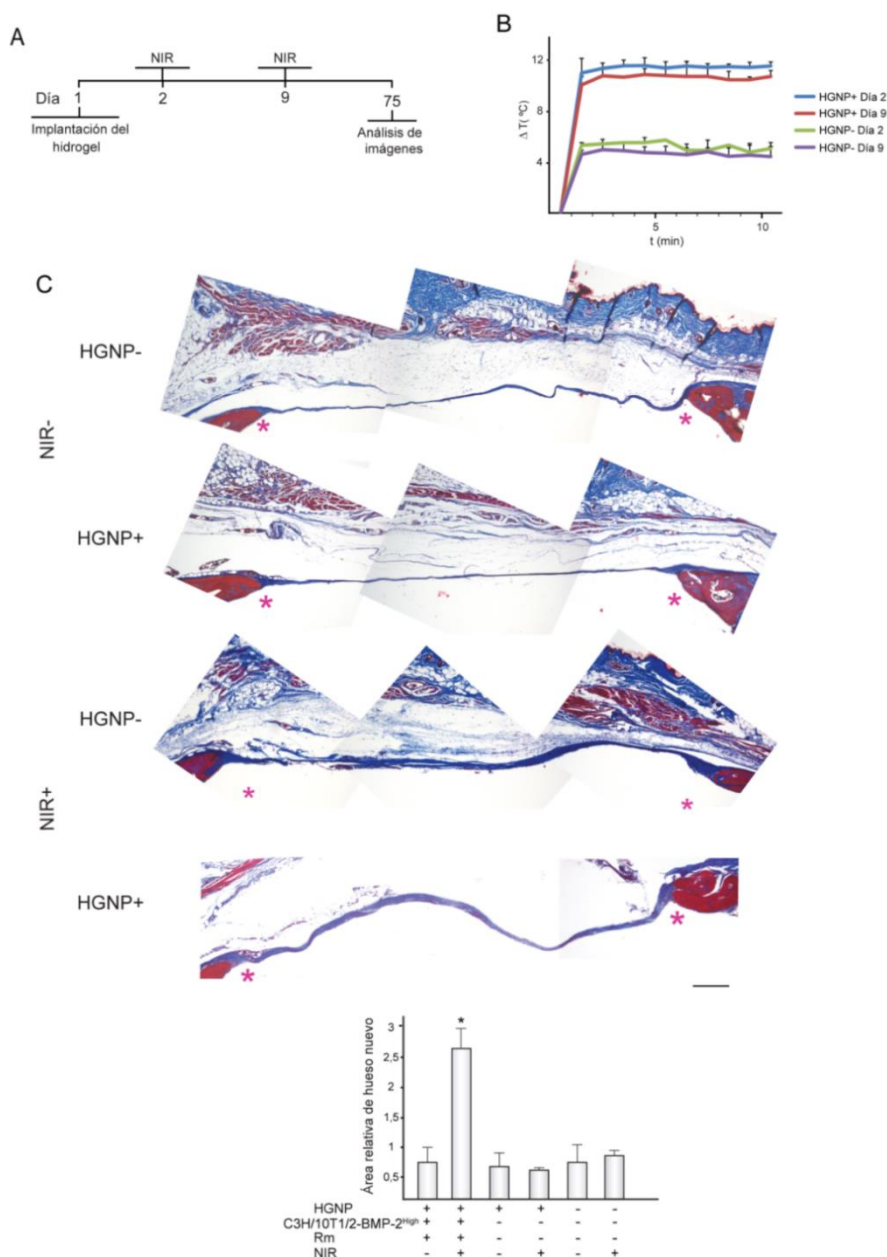


Figura 23. Regeneración ósea inducida por activación de hidrogeles carentes de células. (A) El esquema representa la cronología de la implantación de hidrogeles, irradiación NIR (NIR) y análisis de imágenes. (B) El gráfico muestra los valores promedio + DE de los aumentos máximos de temperatura detectados durante la irradiación NIR, a los tiempos indicados, en el lugar de implantación de hidrogeles polimerizados con HGNP (HGNP+) o sin HGNP (HGNP-), $n = 5$. (C) Tinción de tricrómico de Masson de cortes transversales histológicos de defectos óseos de tamaño crítico. Los asteriscos marcan las posiciones de los márgenes originales de los defectos óseos. El histograma muestra la cuantificación histomorfométrica del hueso formado en los defectos óseos. A efectos comparativos, el histograma muestra los datos correspondientes a ratones implantados con hidrogeles que contienen C3H/10T1/2-BMP-2^{High} y HGNP, a los que se administró rapamicina (Rm) y expuso o no a irradiación NIR (Fig. 21). $n = 5$. *: $p < 0,05$ comparado con todas las demás condiciones. Barras de escala: 250 μm .

2. GENERACIÓN DE HIDROGELES FOTOTÉRMICOS BASADOS EN HGNP ACOPLADAS A TROMBINA

En este apartado se describe el proceso de preparación y caracterización de HGNP acopladas a trombina que, añadidas a la solución de fibrinógeno, generen hidrogeles fototérmicos basados en fibrina. Para preparar estas NP, se ha utilizado un acoplamiento covalente para recubrir HGNP con PLL mediante el uso de COOH-PEG-SH como molécula heterobifuncional espaciadora y enlazadora. El grupo tiol del COOH-PEG-SH se une a la superficie del oro mientras que su grupo carboxilo se une a los grupos amino de la PLL a través de un enlace amida. Las NP funcionalizadas resultantes, HGNP-PLL, pueden cargar eficientemente trombina. El proceso de síntesis y caracterización de las HGNP acopladas a trombina se detalla en el siguiente apartado.

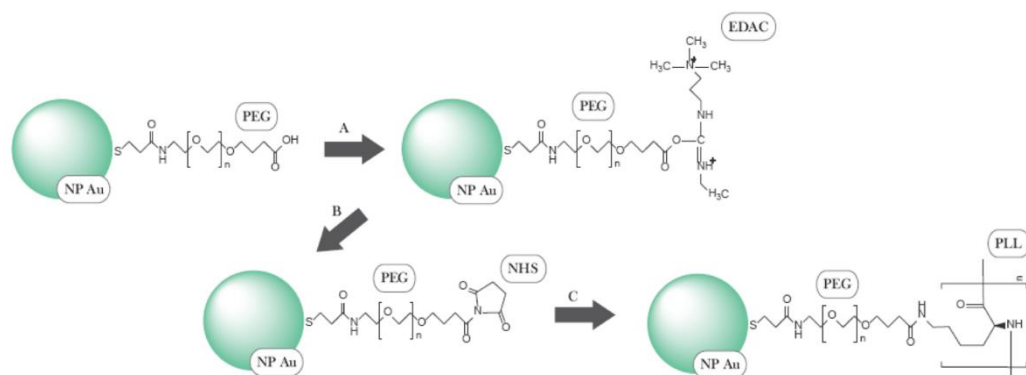
2.1 Caracterización de HGNPT

El acoplamiento entre la trombina y las HGNP, que presentan carga negativa, no se puede lograr de forma directa debido a las fuerzas electrostáticas repulsivas que se crean entre el enzima y las NP. En un trabajo anterior, se demostró que la carga electrocinética de las HGNP se podía revertir mediante una estrategia de conjugación con un polímero catiónico, clorhidrato de polialilamina. Sin embargo, la funcionalización de la superficie de las HGNP utilizando dicho polímero resultó en una concentración local de aminas tan elevada que condujo a una drástica remodelación de las nanopartículas y la consiguiente pérdida de sus propiedades plasmónicas (Prieto y col., 2014). Por ello, en el presente trabajo se exploró una estrategia diferente, basada en el acoplamiento covalente entre PLL y HGNP utilizando una molécula heterobifuncional, COOH-PEG-SH que se une a las HGNP a través de la formación de un enlace tiolato-oro (Hakkinen y col., 2012).

Las HGNP, con geometría esférica y un diámetro medio determinado mediante TEM de $44,0 \pm 9,3$ nm (Fig. 24A, izquierda), aumentaron su tamaño hasta $76,7 \pm 10,8$ nm después de la conjugación con COOH-PEG-SH (Fig. 24A, centro). El recubrimiento con PEG proporcionó un recubrimiento homogéneo al núcleo metálico, observable gracias a una modificación de la técnica de

microscopía electrónica (Brenner y col., 1959). Asimismo, el análisis MP-AES reveló que el contenido de oro de las NP disminuyó de $63,53 \pm 0,21$ % a $38,04 \pm 0,31$ % mientras que el de cobalto se redujo notablemente de $10,77 \pm 0,23$ % a $0,21 \pm 0,04$ %.

A continuación, los grupos carboxilos disponibles en la superficie de HGNP funcionalizadas con COOH-PEG-SH se emplearon para unir covalentemente las aminas primarias presentes en PLL, utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS), como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Preparación de HGNP (NP Au) conjugado con el copolímero PEG-PLL.

Una de las principales ventajas del EDC es su solubilidad en agua, lo que permite realizar el acoplamiento con los grupos amino en ausencia de disolventes orgánicos. La interacción entre el EDC y los ácidos carboxílicos presentes en la superficie de HGNP funcionalizadas con COOH-PEG-SH resulta en la generación de un intermediario inestable de O-acilisourea que se hidroliza rápidamente en soluciones acuosas. La adición nucleofílica de NHS desplazó el agua de los ácidos carboxílicos, previniendo la hidrólisis prematura de los ésteres reactivos. La interacción de NHS con las aminas primarias presentes en PLL condujo a la formación de amidas.

El recubrimiento con el polímero catiónico se reveló como una capa orgánica de geometría irregular que envolvía las HGNP, tal y como mostraron las imágenes obtenidas mediante TEM (Fig. 24A, derecha). El potencial zeta de una suspensión de HGNP en PBS, cuyo valor de potencial zeta a pH 7,4 es de -

27,21 \pm 1,06 mV, adquirió valores positivos tras la conjugación a PLL. La incubación de las HGNP conjugadas a PLL con una disolución de trombina en PBS redujo el potencial zeta de las NP en 10 mV, indicando así la interacción exitosa entre las NP y el enzima (Fig. 24B). Las NP resultantes se denominaron HGNPT. La estabilidad de la conjugación de trombina a las partículas se determinó cuantificando los valores del potencial zeta de suspensiones acuosas de HGNPT almacenadas a 4 °C durante 7 días. Dichos valores experimentaron una ligera reducción al cabo de 3 días, permaneciendo estables hasta el final de periodo de observación (Fig. 24C).

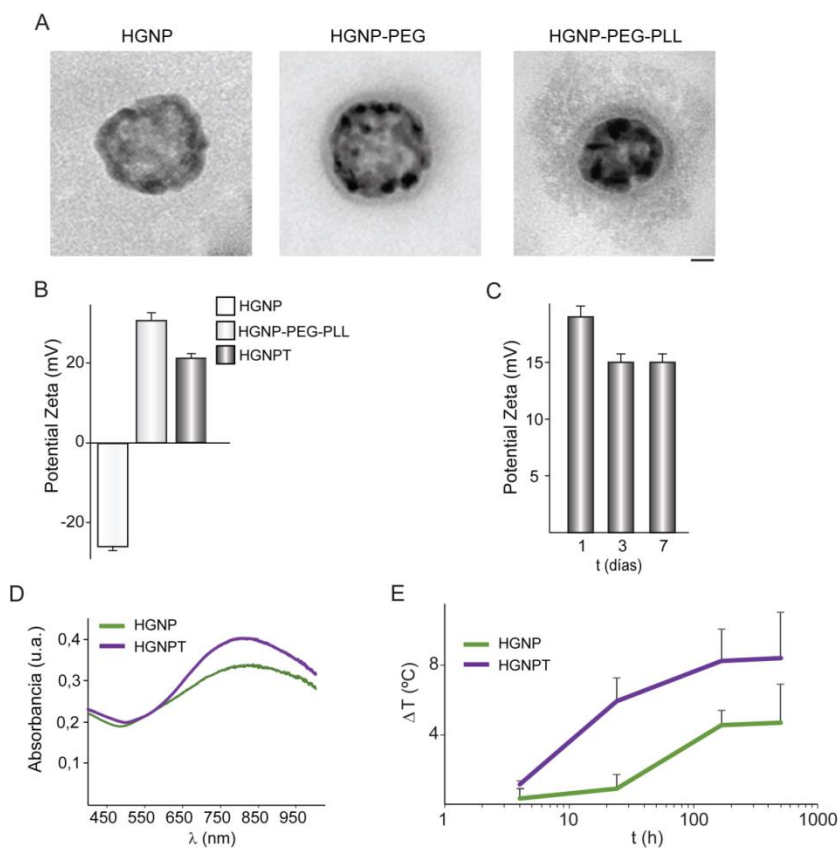


Figura 24. Caracterización de HGNPT. (A) Imágenes obtenidas mediante TEM de HGNP, tras su conjugación con PEG (HGNP-PEG) y con PLL (HGNP-PEG-PLL). (B) La gráfica muestra el potencial zeta de HGNP, HGNP-PEG-PLL y HGNPT recién resuspendidas en agua. (C) Potenciales zetas de HGNPT reconstituidas en agua y posteriormente almacenadas a 4 °C durante 1, 3 y 7 días. (D) Espectros de absorción de dispersiones de HGNP y HGNPT recién resuspendidas en agua. U.a: unidades arbitrarias. (E) Las dispersiones acuosas de HGNP o HGNPT a concentración de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se incubaron a 4 °C o a 37 °C/5 % CO_2 durante los tiempos indicados y se sometieron a irradiación NIR durante 5 min a 44 mW^{-2} . La gráfica muestra los valores promedios + DE de las diferencias de temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$) alcanzada, calculadas según la fórmula: $\Delta T (^{\circ}\text{C}) = T_{\text{máx}} 4^{\circ}\text{C} - T_{\text{máx}} 37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$. Barra de escala: 10 nm.

Los espectros de absorbancia UV-VIS-NIR de suspensiones acuosas de HGNPT y HGNP recién preparadas mostraron un máximo en la región NIR, centrado alrededor de 800 nm (Fig. 24D). Se observó un ligero desplazamiento del plasmón de resonancia que puede atribuirse a diferencias en la constante dieléctrica del medio circundante a la superficie de las NP, debido a la presencia de trombina. La figura 24E muestra la eficiencia fototérmica a lo largo del tiempo de suspensiones de HGNP y HGNPT a concentración $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Después de su reconstitución en agua estéril, las suspensiones se incubaron a 4°C o $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ y al cabo de 1, 7 y 21 días se sometieron a irradiación NIR, durante 5 min a 44 mW^{-2} . Las termografías IR revelaron que la diferencia entre las temperaturas máximas medias alcanzadas tras la irradiación de las muestras incubadas a 4°C y 37°C aumentaba con el tiempo de incubación. En comparación con la incubación a 4°C , las suspensiones de HGNP perdieron alrededor de $4,5^\circ\text{C}$ de su capacidad máxima de calentamiento después de 21 días de incubación a 37°C , mientras que las muestras de HGNPT incubadas bajo las mismas condiciones casi duplicaron esta pérdida.

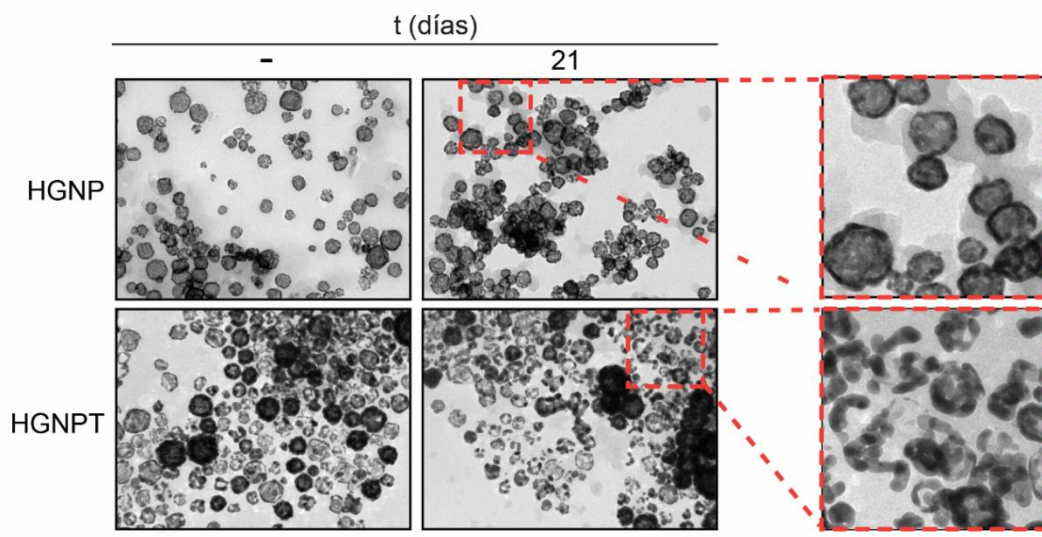


Figura 25. Degradación de HGNP y HGNPT. Imágenes obtenidas mediante TEM de HGNP y HGNPT recién resuspendidas en agua y tras su incubación a $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ durante 21 días. Barra de escala: 100 nm y 25 nm en imágenes ampliadas.

La visualización de las suspensiones de NP por TEM reveló un aumento significativo de especies coloidales con geometría irregular en muestras de HGNPT después de 21 días de incubación a 37 °C/5 % CO₂, efecto que fue menos evidente en las suspensiones de HGNP incubadas en las mismas condiciones (Fig. 25).

Para confirmar que la trombina acopada a las HGNP conserva su actividad funcional, la actividad enzimática de las HGNPT se ensayó empleando el sustrato BOC-Val-Pro-Arg-AFC (Fig. 26). Las HGNPT resuspendidas en agua a 10 µg mL⁻¹ se lavaron con agua desionizada o con DMEM, centrifugando a continuación a 13000 x g durante 10 min. Tras lavar con agua, la actividad catalítica de HGNPT sólo se redujo en un 15 %, mientras que el lavado con DMEM redujo su actividad enzimática en un 94 % (Fig. 26A). La figura 26B muestra que la actividad enzimática de las dispersiones de HGNPT en agua almacenadas a 4 °C permanece estable durante 21 días y luego disminuye. Sin embargo, el lavado de HGNPT con agua estéril disminuyó de forma más acusada y más rápida la actividad de la trombina, lo que indica que el enzima se disocia de las HGNPT. De esta forma, las HGNPT lavadas retuvieron alrededor del 60 % de su actividad enzimática inicial después de 21 días de almacenamiento, y sólo alrededor del 4 % al final del período de observación de 35 días.

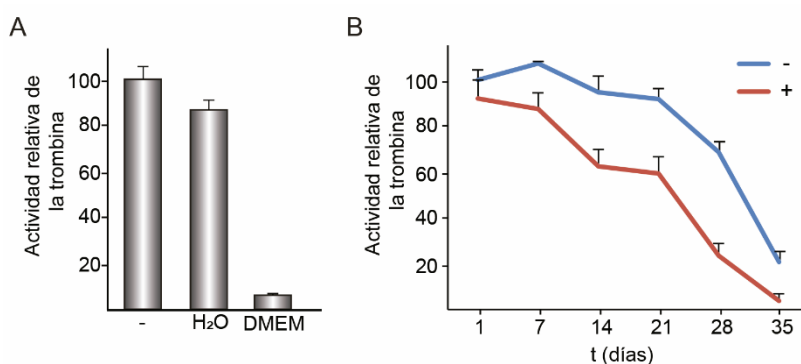


Figura 26. Actividad de la trombina en HGNPT. (A) Actividad enzimática de HGNPT reconstituidas en agua a 10 µg mL⁻¹ (-) y a continuación lavadas con agua o DMEM. (B) Actividad enzimática de HGNPT reconstituidas en agua a 10 µg mL⁻¹ e incubadas hasta 35 días a 4 °C. A los tiempos indicados, las suspensiones se lavaron (+) o no (-) con agua y se determinó la actividad de la trombina. Los valores promedios + DE son relativos a las muestras no lavadas y recién reconstituidas (A) o incubadas 1 día a 4 °C (B), a las que se les dio el valor arbitrario de 100.

2.2 Polimerización de hidrogeles preparados con HGNPT

Para evaluar la dinámica de la polimerización de la fibrina catalizada por la actividad enzimática de HGNPT, se realizaron pruebas reológicas durante la polimerización *in situ* del fibrinógeno disuelto en el DMEM y suplementado con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina o con HGNPT a 10 µg mL⁻¹ (Fig. 27). Como control, se ensayaron suspensiones de fibrinógeno a las que no se añadió trombina ni HGNPT y en las que no se evidenció polimerización. Cuando se añadió trombina al fibrinógeno (Fbg+T), la polimerización de la fibrina comenzó tan pronto como la temperatura de la muestra alcanzó los 15 °C mientras que los valores del módulo elástico (G') del hidrogel aumentaban al incrementar la temperatura de la muestra. Después de la incubación a 37 °C durante 110 s, G' se estabilizó en valores 500 veces superiores que los correspondientes a 15 °C. La dinámica de la polimerización fue indistinguible a la de muestras suplementadas o no con HGNP (Fbg+T+HGNP). El reemplazo de la trombina soluble por HGNPT (Fbg+HGNPT) previno la polimerización por debajo de 37 °C. La rigidez de los hidrogeles generados por la actividad de la trombina acoplada a HGNPT fue comparable a la de los hidrogeles generados con el enzima soluble sólo después de 300 s de incubación a 37 °C (Fig. 27A). Estos resultados sugieren que la asociación de la trombina a la nanopartícula plasmónica limita la disponibilidad del enzima, condicionando así la cinética del proceso.

La figura 27B muestra imágenes de la estructura aparente de los hidrogeles de fibrina preparados usando 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble o HGNPT a 10 µg mL⁻¹. Las imágenes se obtuvieron mediante SEM, y se puede observar que ambos hidrogeles presentan una estructura altamente porosa con poros interconectados a escala micrométrica. El tamaño medio de los poros de los hidrogeles basados en HGNPT es sólo ligeramente mayor que el de los hidrogeles preparados con trombina soluble, por lo que hipotetizamos que su funcionalidad será similar

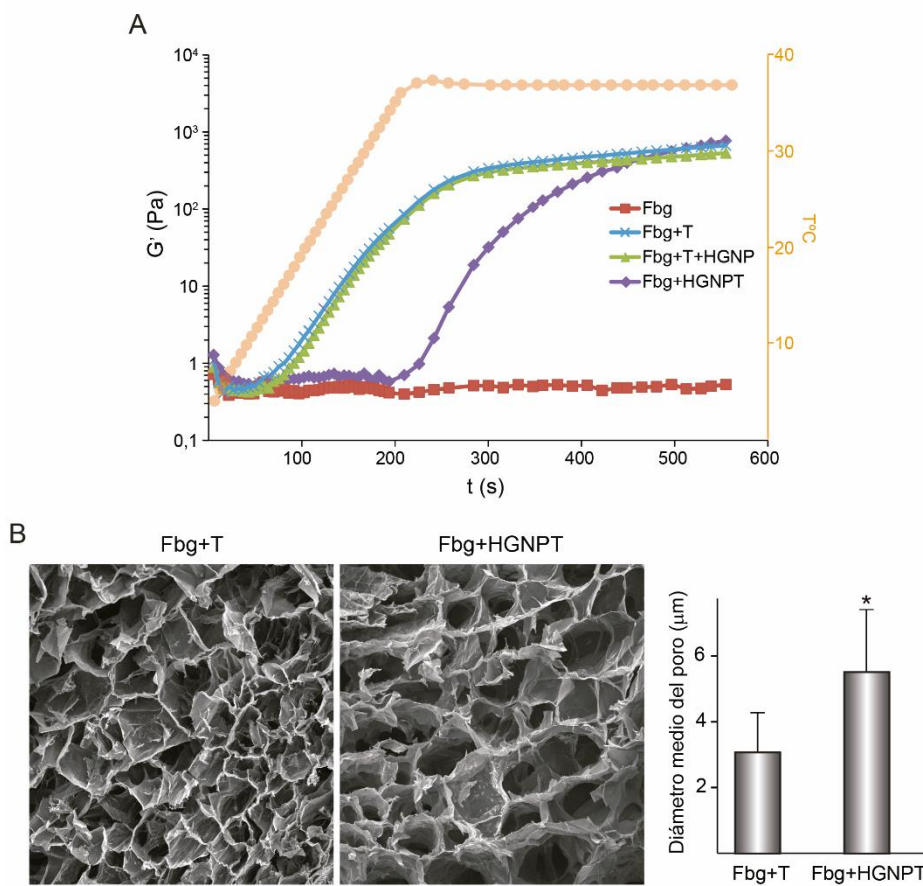


Figura 27. Polimerización de hidrogeles de fibrina con HGNPT. (A) Análisis reológico de la polimerización del fibrinógeno (Fbg) en hidrogeles preparados con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble (T) en presencia (Fbg+T+HGNP) o ausencia de HGNP a 10 μg mL⁻¹ (Fbg+T), o en presencia de HGNPT a 10 μg mL⁻¹ (Fbg+HGNPT), en función de la temperatura. (B) Imágenes obtenidas mediante SEM del interior de hidrogeles de fibrina preparados con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble (Fbg+T) o HGNPT a 10 μg mL⁻¹ (Fbg+HGNPT). El gráfico muestra el diámetro medio del poro de estos hidrogeles, n = 200 (derecha). Barra de escala: 50 μm.

2.3 Respuesta a NIR de hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT

Tras determinar la dinámica de polimerización de los hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT, nos propusimos evaluar su capacidad fototérmica. Para ello se prepararon hidrogeles de fibrina conteniendo HGNP a concentraciones entre 5 a 15 μg mL⁻¹ y 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble o conteniendo HGNPT a concentraciones entre 2,5 a 7,5 μg mL⁻¹. La figura 28A muestra la espectroscopia UV-VIS-NIR de un hidrogel de fibrina preparado con HGNPT a 10 μg mL⁻¹. Con un pico de absorbancia máximo centrado a 800 nm, el espectro

es similar al de un hidrogel polimerizado con trombina soluble y conteniendo idéntica concentración de HGNP. Tras un día de incubación a 37 °C/5 % CO₂, los hidrogeles se irradiaron con un láser NIR que emite a 44 mW mm⁻². Los estudios de termografía IR revelaron que la eficiencia fototérmica de los hidrogeles polimerizados con HGNPT a 5 µg mL⁻¹ es sólo ligeramente inferior a la de matrices de fibrina polimerizadas con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble en presencia de 5 µg mL⁻¹ de HGNP (Fig. 28B). Al aumentar la concentración de HGNPT en la suspensión de fibrinógeno, la eficiencia fototérmica de los hidrogeles resultantes aumentó de manera dependiente de la dosis, alcanzando o incluso superando la de los hidrogeles preparados con dosis menores de HGNP y trombina soluble.

Para averiguar si los hidrogeles preparados con HGNPT son andamiajes adecuados para aplicaciones de ingeniería tisular, se incluyeron células C3H/10T1/2 durante el proceso de polimerización. Tras incubar 24 h a 37 °C/5 % CO₂, los hidrogeles se seccionaron transversalmente y se sometieron a tinción con faloidina-TRITC y con Hoechst 33342 para visualizar los filamentos de actina y núcleos celulares, respectivamente. En la figura 29A, se muestra la distribución homogénea de las células, tanto en hidrogeles polimerizados con HGNPT a 15 µg mL⁻¹ como en hidrogeles polimerizados con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble en presencia de HGNP a 15 µg mL⁻¹.

A continuación, se realizaron estudios de viabilidad de las células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles polimerizados con HGNPT tras su cultivo durante 1 a 7 días. No hubo diferencias significativas en las actividades metabólicas de estas células en hidrogeles de fibrina generados con HGNPT a 10 µg mL⁻¹ o con 2 unidades NIH mL⁻¹ de trombina soluble y HGNP a 10 µg mL⁻¹ (Fig. 29B). La viabilidad de las células contenidas en los hidrogeles no se vio afectada cuando en los hidrogeles se duplicó la concentración de HGNPT. Se estudió asimismo la actividad fibrinolítica de las células C3H/10T1/2 incluidas en estos hidrogeles. Para ello, durante la preparación del hidrogel, la suspensión de fibrinógeno se suplementó con Fbg-AF546 determinandose la liberación al medio de cultivo de productos de degradación conteniendo AF546.

En línea con lo observado en los ensayos de viabilidad celular, la remodelación de la fibrina fue similar en intermediarios celulares preparados con HGNPT o con trombina soluble (Fig. 29C). En conjunto, estos resultados muestran que los andamiajes fototérmicos generados con HGNPT muestran una excelente citocompatibilidad, indistinguible de la de hidrogeles preparados con HGNP.

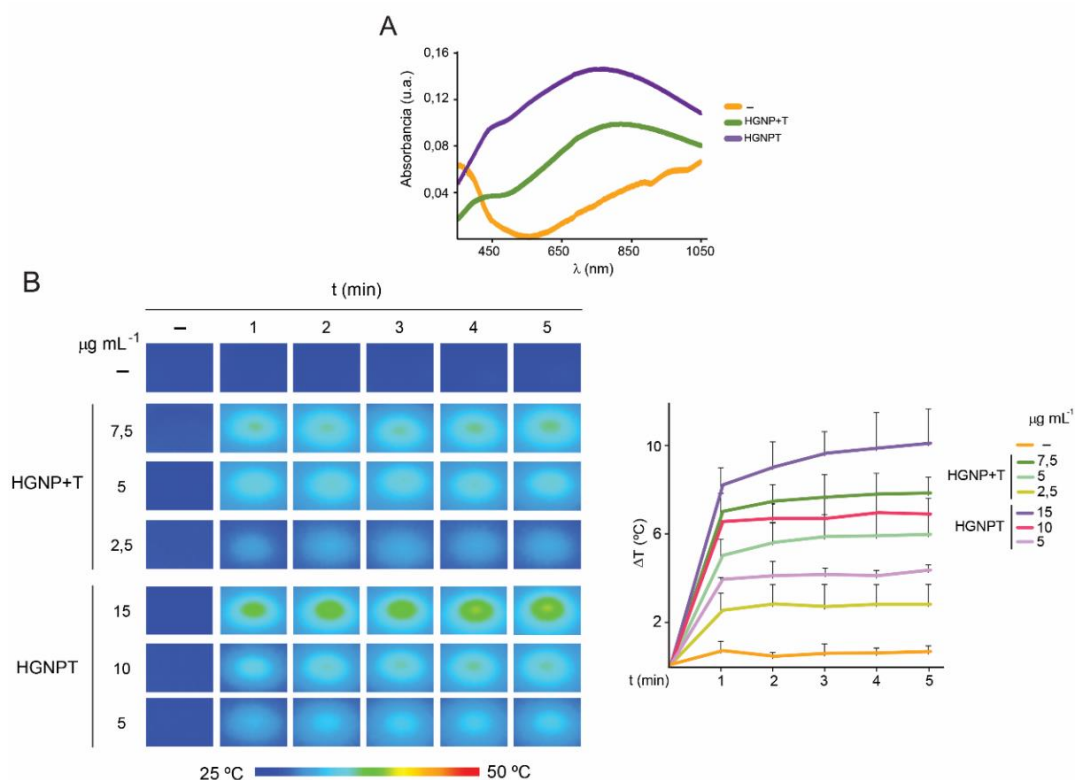


Figura 28. Caracterización fototérmica de hidrogeles preparados con HGNPT. (A) Espectros de absorción de hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNPT) o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble en ausencia (-) o presencia de HGNP a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNP+T). u. a.: unidades arbitrarias. (B) Termografías IR de hidrogeles de fibrina preparados con las concentraciones indicadas de HGNPT o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas de HGNP (HGNP+T), que se irradiaron con un láser NIR a 44 mW mm^{-2} , a los tiempos indicados (izquierda). El gráfico muestra los valores promedios + DE de los aumentos máximos de temperatura detectados durante la irradiación NIR, $n = 3$ (derecha).

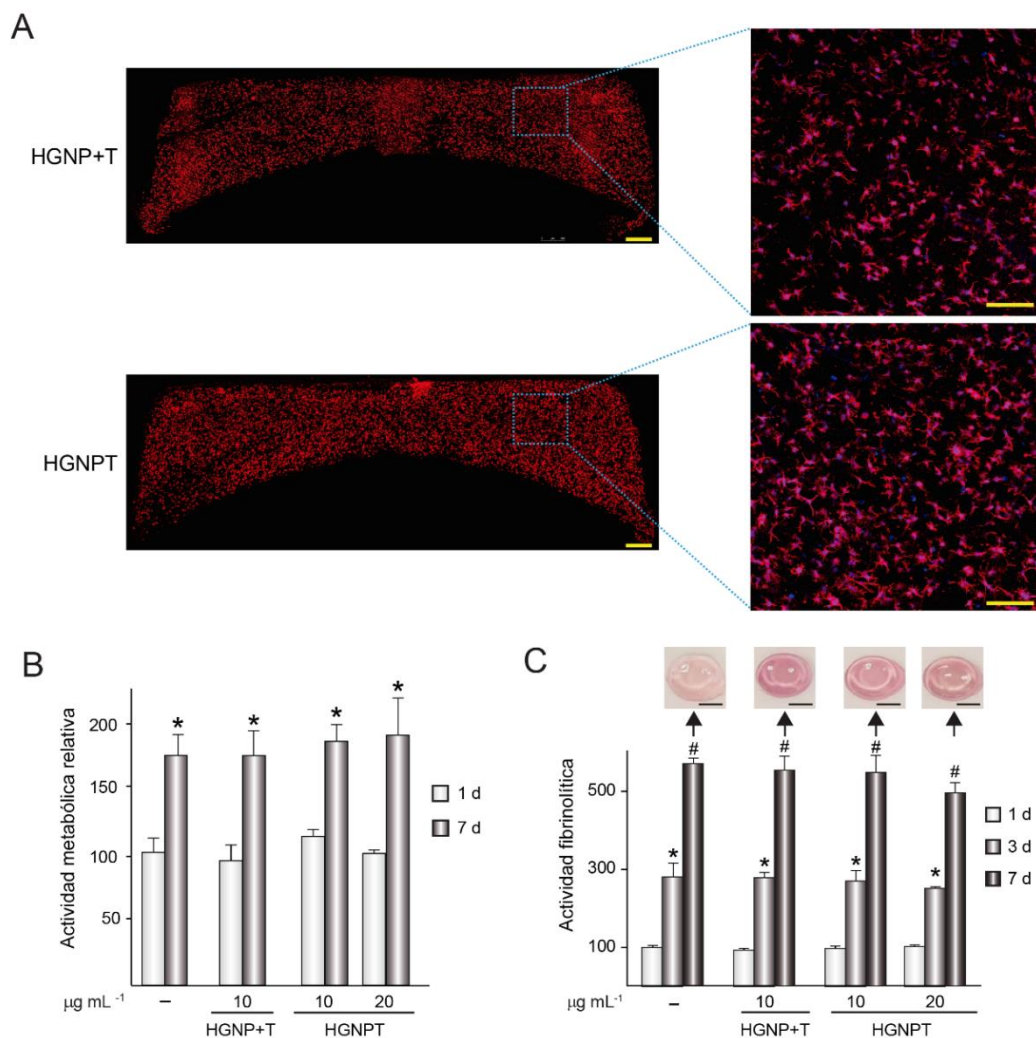


Figura 29. Caracterización de los hidrogeles polimerizados con células C3H/10T1/2 y HGNPT. (A) Células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNPT) o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble y HGNP a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNP+T) que fueron incubados durante 24 h a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Se obtuvieron imágenes transversales de los hidrogeles mediante CLSM. La actina está teñida de rojo y los núcleos celulares de azul. Barra de escala: $500 \mu\text{m}$ y $100 \mu\text{m}$ en las ampliaciones. (B) El histograma muestra las actividades metabólicas de las células C3H/10T1/2 incluidas en hidrogeles de fibrina preparados con las concentraciones indicadas de HGNPT o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble en ausencia (-) o presencia de HGNP a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNP+T), después de 1 o 7 días de cultivo. (C) La gráfica muestra la liberación de productos de degradación conteniendo AF546 al medio de cultivo de los intermediarios celulares descritos en (B) después de 1, 3 y 7 días de cultivo. Las fotografías corresponden a hidrogeles cultivados durante 7 días. Los valores promedio + DE son relativos a las muestras sin NP cultivadas durante 1 día, a las que se les dio el valor arbitrario de 100. *: $p < 0,05$ comparado con 1 día de cultivo. #: $p < 0,05$ en comparación con 3 días de cultivo. Barra de escala: 5 mm .

2.4 Inducción de la expresión transgénica en hidrogeles fototérmicos preparados con HGNPT

Para estudiar la capacidad de los hidrogeles fototérmicos preparados con HGNPT como plataformas que permitan la expresión transgénica inducible mediante hipertermia óptica, se incorporaron células C3H/10T1/2-fLuc durante el proceso de polimerización. Se prepararon intermediarios tisulares con HGNPT a $10\text{--}15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble y HGNP a $5\text{--}7,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Tras incubar los intermediarios tisulares durante 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ }\%$ CO_2 , se trataron con rapamicina e irradiaron con un láser NIR a 44 mW mm^{-2} durante 10 min. Después de 24 h de cultivo, los hidrogeles se analizaron mediante bioluminiscencia, observando que los generados utilizando HGNPT estimulan la actividad de fLuc en las células que incluyen (Fig. 30, izquierda).

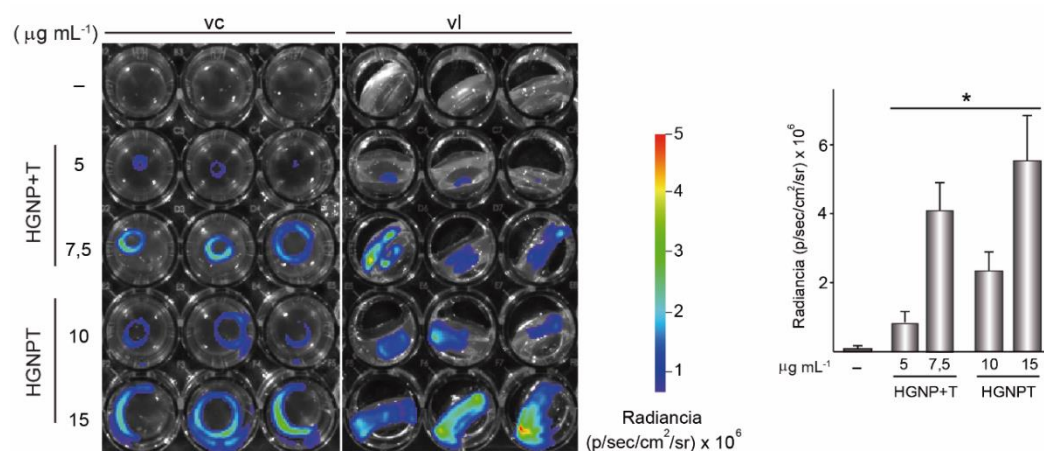


Figura 30. Expresión transgénica inducida *in vitro* por la actividad fototérmica de hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT. Imágenes de bioluminiscencia de hidrogeles conformados en ausencia (-) o presencia de HGNPT a 10 o $15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina y HGNP a 5 o $7,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNP+T). Todos los hidrogeles incorporaron células C3H/10T1/2-fLuc. Tras incubar 24 h a $37^{\circ}\text{C}/5\text{ }\%$ CO_2 , los hidrogeles se trataron con rapamicina y se expusieron a irradiación NIR. Tras 24 h se tomaron imágenes de bioluminiscencia de la superficie irradiada del hidrogel (vc; vista cenital) y de un lateral (vl; vista lateral). El gráfico muestra los valores promedio + DE de los niveles de radiancia de la luminiscencia inducida en la superficie irradiada de los hidrogeles, $n = 3$. *: $p < 0,05$ comparado con hidrogeles sin NP.

Tanto en los hidrogeles preparados con HGNPT como en los preparados con HGNP y trombina soluble, la actividad fLuc inducida en los hidrogeles fototérmicos siguió un patrón toroidal, expandiéndose radialmente desde el punto de incidencia del láser y profundizando desde la superficie de irradiación a lo largo del eje Z. En ambos casos, el tamaño de la región de inducción del transgén aumenta con la concentración de NP. Se observó asimismo que la región central carecía de actividad transgénica, como consecuencia de un calentamiento excesivo que interrumpe las funciones biológicas de las células incluidas en esa zona. De acuerdo con los datos mostrados en la figura 28B, la concentración de HGNPT durante la polimerización de hidrogeles fototérmicos puede ajustarse para inducir niveles de expresión transgénica comparables a los obtenidos en hidrogeles preparados con trombina soluble y HGNP (Fig. 30, izquierda). No se detectó actividad transgénica alguna en hidrogeles carentes de NP.

Para evaluar si los hidrogeles fototérmicos de fibrina preparados con HGNPT pueden emplearse para desencadenar la expresión transgénica *in vivo* utilizando hipertermia óptica, se inyectaron por vía subcutánea los precursores de hidrogeles, una mezcla de fibrinógeno que contenía células C3H/10T1/2-fLuc y HGNPT a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, en la región dorsal de ratones C3H/HeNRj adultos (Fig. 31). La solución inyectada polimerizó *in situ* con la misma consistencia y extensión que las mezclas que contenían HGNP a $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble, empleadas como control. Para inducir la expresión de fLuc, los ratones implantados durante un día se trataron con rapamicina y se irradió el área de implantación durante 10 min (Fig. 31A). La potencia de salida del láser se ajustó entre $17\text{-}21 \text{ mW mm}^{-2}$ para mantener un aumento neto máximo de 12°C en la superficie del área irradiada, evitando la generación de daño tisular por estrés térmico.

Los ensayos de bioluminiscencia realizados 24 h después de la irradiación NIR mostraron la inducción de la actividad fLuc tanto en implantes preparados con HGNPT como con HGNP y trombina soluble (Fig. 31B, panel izquierdo).

La disposición espacial de la actividad transgénica fue similar en los hidrogeles irradiados con NIR generadas con HGNPT o HGNP y trombina soluble. Es importante destacar que este resultado excluye que las diferencias observadas en la cinética de polimerización de las matrices de fibrina preparadas con trombina soluble o conjugada con HGNP (Fig. 27A) influyan en el comportamiento *in vivo* de los implantes plasmónicos. La cuantificación de la bioluminiscencia reveló niveles de actividad enzimática similar en los implantes generados con trombina soluble y HGNP o en los implantes generados con HGNPT (Fig. 31B, panel central y derecho). La irradiación no estimuló la actividad fLuc en el grupo control que albergaba implantes que no contenían NP.

Quince días después de la irradiación NIR, se extrajeron los implantes y tejidos circundantes y se procesaron para su análisis histológico (Fig. 32). La implantación desencadenó una leve reacción de cuerpo extraño caracterizada por la infiltración de células mononucleares a través de la superficie del hidrogel y la encapsulación del material exógeno en una matriz de colágeno sólido. Este efecto es atribuible a la capacidad de la fibrina de reclutar células inmunitarias hacia el biomaterial (Szaba y col., 2002; Flick y col., 2004). La reacción del cuerpo extraño hacia los implantes irradiados que contenían HGNPT fue similar a la mostrada por los implantes irradiados con HGNP o que carecían de NP (Fig. 32).

La irradiación no dio lugar a daño alguno en la piel o en los tejidos subyacentes que recubrían los implantes sin NP (Fig. 32, panel superior). Del mismo modo, la irradiación de implantes que incorporaban HGNP o HGNPT no provocó daño tisular (Fig. 32, panel central e inferior). En conjunto, estos resultados indican que los hidrogeles fototérmicos preparados con HGNPT son totalmente biocompatibles y funcionales.

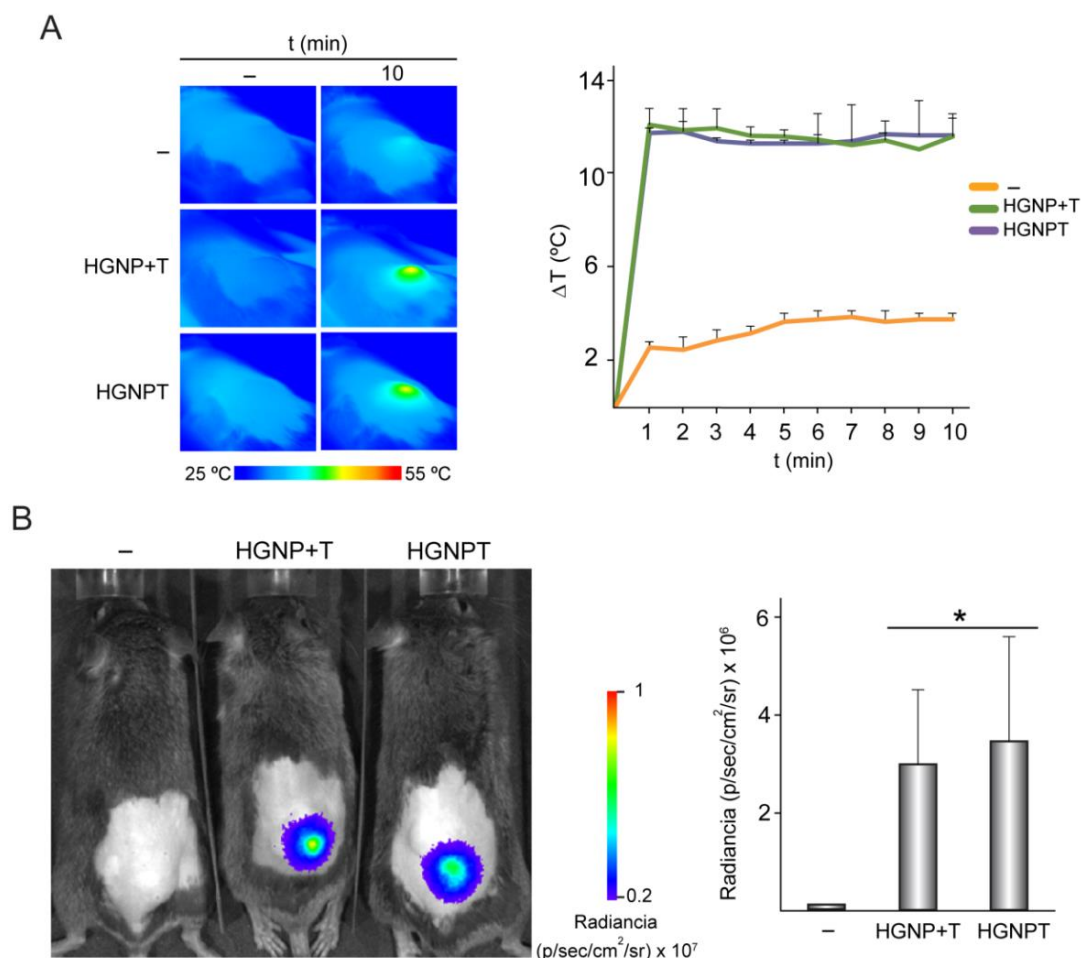


Figura 31. Expresión transgénica inducida *in vivo* por la actividad fototérmica de hidrogeles de fibrina preparados con HGNPT. (A) Termografías de animales implantados con hidrogeles conformados con HGNPT a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNPT) o con 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina soluble en ausencia (-) o presencia de HGNP a $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HGNP+T). Todos los hidrogeles incorporaron células C3H/10T1/2-fLuc. Los animales fueron tratados con rapamicina y la zona de implantación se sometió a irradiación NIR durante 10 min (izquierda). El gráfico muestra los valores promedio + DE de los aumentos de temperatura máxima detectados en el lugar de implantación durante la irradiación NIR, $n = 3$ (derecha). (B) Imágenes de bioluminiscencia de ratones implantados 24 h después de la irradiación NIR. El gráfico muestra los niveles medios de radiación de luminiscencia detectados en el lugar de la implantación. $n = 3$. *: $p < 0,05$ comparado con el grupo implantado con hidrogeles que carecen de NP.

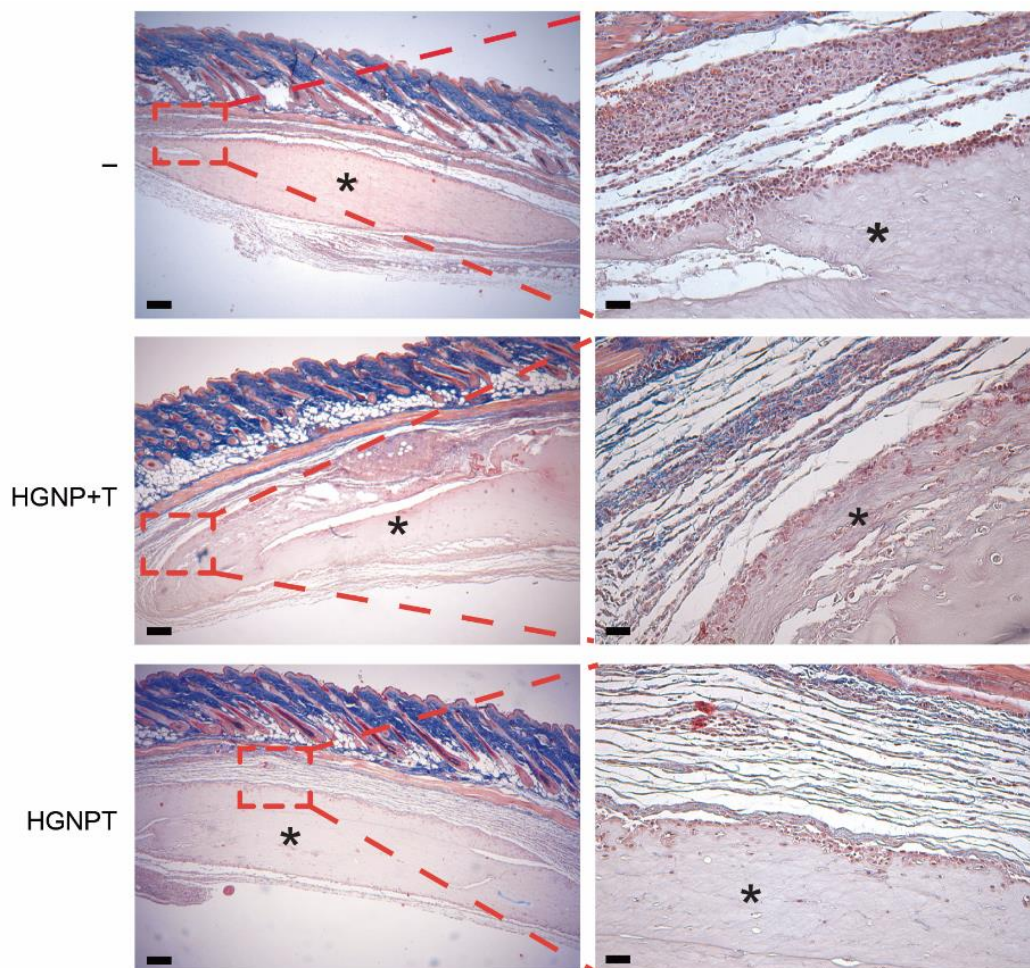


Figura 32. Análisis histológico del área de implantación de hidrogeles preparados con HGNPT. Secciones transversales histológicas de hidrogeles implantados en la región dorsal de ratones y de los tejidos circundantes, recuperados 15 días después de la irradiación NIR. Los asteriscos indican el hidrogel implantado. Barras de escala: 100 μm (paneles izquierdos), 25 μm (paneles derechos).

DISCUSIÓN

Trabajos existentes en la literatura indican que la sobreexpresión controlada del transgén BMP-2 beneficia el proceso de regeneración ósea (Moutsatsos y col., 2001; Gafni y col., 2004; Koh y col., 2006). Dicho control se presume imprescindible para mejorar la seguridad de los protocolos de terapia génica que persiguen incrementar los niveles de transgenes con potente bioactividad, como son los factores de regeneración. Lieberman y col. publicaron en 1999 un estudio pionero, en el que se demostraba que la sobreexpresión de BMP-2 era capaz de regenerar defectos críticos generados en fémur de ratas. En estas lesiones se implantó matriz ósea desmineralizada conteniendo células madre de médula ósea que expresaban constitutivamente BMP-2. Con fines comparativos, en otros animales se implantó en los defectos óseos matriz desmineralizada conteniendo rBMP-2. Los análisis histológicos de los defectos óseos, efectuados al cabo de dos meses de la implantación, revelaron que las lesiones que habían recibido células que secretaban BMP-2 mostraban gruesas trabéculas, mientras que en las que se implantó rBMP-2, el hueso era delgado, con forma de “encaje”. Con el fin de determinar el momento idóneo en el que el factor osteoinductor debe ser sobreexpresado, se han empleado vectores adenovirales que expresan constitutivamente BMP-2 y que se han administrado a diferentes tiempos tras la generación de una lesión. Así, se generaron defectos de tamaño crítico en fémur de rata en los que se inyectaron dichos vectores en el momento de la generación del defecto, así como al cabo de 1, 5 y 10 días. Se observó que la administración efectuada al cabo de 5 y 10 días mejoraba significativamente la formación de nuevo hueso, en comparación con los animales que recibieron el virus en días anteriores (Betz y col., 2007; Betz y col., 2007). Aunque es indiscutible que la disminución de la inflamación y la formación de hematoma en los días posteriores a la generación de la lesión ósea favorecen el acceso del vector a las células diana, estos resultados también sugieren que el acoplamiento de la actividad de la BMP-2 transgénica a la respuesta endógena al daño tiene un papel decisivo en el éxito de esta aproximación. El desarrollo de diversos circuitos génicos inducibles ha permitido expresar transgenes en el momento deseado (Vilaboa y col., 2015), estrategia que se ha empleado para controlar el perfil de expresión temporal de la BMP-2 transgénica. Por ejemplo, se han

explorado los sistemas inducibles que dependen de tetraciclina o de su análogo doxiciclina, con mayor potencia en la inducción del transgén. El trasplante de células madre genéticamente modificadas para expresar BMP-2 bajo el control de este tipo de sistema inducible promovió la regeneración de fracturas de radio (Moutsatsos y col., 2001) y de defectos de tamaño crítico en calvaria (Gafni y col., 2004) de ratones. Sin embargo, en estos trabajos, se observó en algunos casos una formación ósea excesiva, resultado que se atribuyó a que la sobreexpresión de BMP-2 transgénica continúa una vez se interrumpe la administración de doxiciclina, es decir, más allá de la ventana temporal deseable. Este fenómeno podría estar vinculado al tropismo óseo que experimentan la tetraciclina y sus derivados, que se acumulan en el tejido mineralizado, interfiriendo con la regulación deliberada de la expresión transgénica que depende de estos compuestos (Oklund y col., 1981). Finalmente, se ha observado que algunos factores de transcripción endógenos, como el factor GATA, o factores inducibles por el interferón α , presentan afinidad por los promotores que responden a transactivadores regulables por tetraciclina y derivados, lo que resulta en la expresión de una cantidad significativa del transgén de interés en ausencia de agente inductor, y por tanto compromete la capacidad de regulación del sistema (Gould y col., 2004). Con el fin de solventar estos problemas, se ha explorado la capacidad de circuitos génicos que dependen de agentes dimerizadores para controlar el patrón temporal de la expresión de BMP-2 (Koh y col., 2006). Se generó un defecto crítico en calota de ratón, implantándose a continuación en el defecto una esponja de colágeno en la que se embebieron fibroblastos que expresan BMP-2 bajo el control de un sistema dependiente de rapamicina. De forma paralela y como control, en defectos creados en otros animales se implantaron esponjas en las que se embebieron fibroblastos que expresan BMP-2 constitutivamente. Los animales que recibieron fibroblastos que expresaban de forma inducible BMP-2 fueron tratados en días alternos con rapamicina, durante 6 semanas, lo que dio lugar a una formación ósea uniforme, sin sobrecrecimiento óseo. Por el contrario, los animales que recibieron fibroblastos que expresan BMP-2 constitutivamente presentaron un hueso neoformado altamente irregular y pobremente integrado

con el tejido circundante. Estos resultados demostraron que, en comparación con los elevados, pero transitorios, niveles de actividad transgénica que proporciona el sistema constitutivo, se obtienen resultados significativamente mejores en cuanto a la calidad del tejido óseo regenerado cuando se generan niveles de BMP-2 menores, pero sostenidos, empleando sistemas inducibles. Mientras Koh y col. (2006) demuestran la superioridad del sistema inducible frente al constitutivo, la aplicación clínica de esta estrategia terapéutica requerirá del uso de sistemas génicos que no solo permitan el control temporal de la expresión del transgén sino también el control de su localización, con el fin de evitar reacciones adversas en tejidos u órganos no necesitados de terapia a los que puedan acceder los vectores. Por ello, en el presente trabajo se empleó un circuito génico que combina elementos para el control temporal de la expresión transgénica, mediante administración de rapamicina, así como para su control espacial mediante la aplicación de un estímulo térmico (Martín Saavedra y col., 2013). Como vehículos para sobreexpresar BMP-2 se han empleado células C3H/10T1/2-BMP-2 que integran establemente en su genoma este circuito, que supera las limitaciones de los circuitos génicos que únicamente utilizan promotores de genes de choque térmico ya que evita la activación transgénica accidental desencadenada por hipertermia no planificada. Además, la posibilidad de reinducir la expresión de BMP-2 mediante activación secuencial del circuito nos permitiría emular deliberadamente la producción secuencial de BMP-2 que se observa durante la regeneración normal de los huesos, en la que la expresión de BMP-2 se detecta por primera vez durante la inflamación temprana y aumenta posteriormente durante la reacción perióstica (Ai-Aql y col., 2008). Estudios previos de nuestro grupo de investigación exploraron la capacidad del circuito para inducir la producción del factor de crecimiento VEGF a partir de células transgénicas incluidas en hidrogeles fototérmicos de fibrina. Los intermediarios tisulares resultantes fueron implantados subcutáneamente en la región dorsal de ratones C3H/HeNRj y tras administrar rapamicina se procedió a la irradiación NIR de la zona implantada. Al cabo de 4 días se observó la aparición de una zona hiperémica en el área irradiada. Este resultado demostraba que las propiedades ópticas de estos hidrogeles pueden aprovecharse para controlar *in*

vivo deliberadamente la producción espacio-temporal de un factor de crecimiento, empleando un circuito génico activable por calor y dependiente de dimerizador (Martin-Saavedra y col., 2014). Como agente adhesivo, la fibrina se usa de forma generalizada en diversas aplicaciones clínicas destinadas a reparar tejidos o facilitar el cierre de las heridas (Lakshman y col., 2020). En estudios anteriores de nuestro grupo, los intermediarios tisulares se prepararon utilizando fibrinógeno a 10 mg mL^{-1} y 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina que resultaron adecuados para la incorporación de células que albergan el circuito inducible (Martin-Saavedra y col., 2014; Martin-Saavedra y col., 2018; Escudero-Duch y col., 2019). En los experimentos mostrados en esta memoria, aumentamos la concentración de fibrinógeno a 20 mg mL^{-1} con el objetivo de proporcionar mejores propiedades estructurales y mecánicas a los hidrogeles que se implantarán en una lesión ósea. Concentraciones similares e incluso más elevadas han sido empleadas por otros autores para preparar intermediarios tisulares inyectables destinados a ser empleados en aplicaciones de ingeniería tisular ósea. Por ejemplo, Kim y col. (2014) estudiaron las propiedades estructurales y mecánicas de hidrogeles de fibrina preparados con 10 y 40 mg mL^{-1} de fibrinógeno. La porosidad de los hidrogeles preparados con fibrinógeno a 40 mg mL^{-1} fue aproximadamente un 15 % menor que la de los preparados con 10 mg mL^{-1} , mientras que la capacidad de soportar cargas mecánicas fue 3 veces mayor (Kim y col., 2014). Catelas y col. (2006) determinaron que andamios de fibrina preparados con fibrinógeno a 50 mg mL^{-1} y 2 unidades NIH mL^{-1} de trombina permitían el crecimiento de las células madre mesenquimales humanas, mejorando su potencial de diferenciación osteogénica en comparación con la de andamios preparados con fibrinógeno a 5 mg mL^{-1} y la misma concentración de trombina. Por lo tanto, en este trabajo hemos utilizado concentraciones de fibrinógeno y trombina que se encuentran en el rango de los empleados para preparar otros hidrogeles de fibrina que se han estudiado para aplicaciones de ingeniería tisular ósea. Los ensayos *in vitro* determinaron la concentración óptima de HGNP para generar hidrogeles fototérmicos, así como el tiempo de irradiación NIR necesario para inducir la expresión de BMP-2 en las células genéticamente modificadas que se incluyeron en su estructura. Se

seleccionaron parámetros de irradiación, en cuanto a tiempo y potencia, que daban lugar a una hipertermia leve y sostenida con el fin de maximizar los niveles de producción del factor de crecimiento de las células transgénicas y, al mismo tiempo, minimizar el daño celular por calentamiento. Dicho daño podría comprometer no solo la viabilidad celular y la producción de BMP-2 transgénica sino la degradación del hidrogel, dependiente de la actividad fibrinolítica de las células incluidas en ellos. En este sentido, observamos que la viabilidad celular disminuía en los intermediarios tisulares irradiados de forma dependiente al tiempo de exposición a la luz NIR, es decir, de la intensidad del estímulo térmico. Observamos asimismo que los intermediarios tisulares irradiados se degradaban *in vitro* de forma significativamente más lenta que los no irradiados. Los ensayos *in vitro* también indicaron que, de acuerdo al diseño del circuito génico, era posible activar el circuito mediante irradiación NIR en presencia de dimerizador y desactivarlo mediante retirada de este agente. Detectamos que, tras su desactivación, era posible una segunda reactivación mediante reirradiación NIR en presencia de dimerizador. En comparación con la activación *in vitro*, efectuada empleando una potencia de 44 mW mm^{-2} , la irradiación de hidrogeles implantados requirió un fino ajuste de la energía NIR depositada, para minimizar el posible daño por sobrecalentamiento del tejido. Estudios previos de nuestro grupo habían detectado que la activación de hidrogeles fototérmicos implantados subcutáneamente en ratones C3H/HeNRj conduce a una elevada expresión transgénica (Martin-Saavedra y col., 2014). Estos hidrogeles albergaban células derivadas de C3H/10T1/2, en cuyo genoma se había incluido un circuito génico activable por calor y dependiente de rapamicina para controlar la expresión de fLuc o VEGF, transgenes cuya producción pudo ser eficientemente inducida tras la irradiación NIR de la zona implantada durante 10 min empleando una potencia de $11\text{-}17 \text{ mW mm}^{-2}$. Como se muestra en el presente trabajo, similares condiciones de activación estimularon la actividad del transgén fLuc en intermediarios tisulares fototérmicos implantados en el defecto crítico generado en calvaria. Tal y como indicaron los ensayos de bioluminiscencia, la activación fue coincidente con la zona irradiada del hidrogel implantado en la lesión ósea. La inducción de la actividad fLuc no se detectó únicamente después de una

primera ronda de activación, sino también después de una segunda ronda realizada una semana después de la primera. Idéntica metodología de activación en dos rondas fue aplicada para inducir *in vivo* la producción secuencial de BMP-2 en la región osteotomizada, dando lugar a la formación de nuevo tejido mineralizado que redujo el tamaño de las lesiones óseas tratadas. Un inconveniente del circuito génico empleado en este trabajo se relaciona con el efecto de la rapamicina en el metabolismo óseo (Romero y col., 1995; Stempfle y col., 2002; Compston y col., 2003; Alvarez-Garcia y col., 2007). En efecto, los estudios de bioactividad *in vitro* demostraron que, a la concentración utilizada para inducir la expresión de BMP-2, la rapamicina afectaba la diferenciación condrogénica de células C3H/10T1/2, interferencia que no se observó cuando se empleó el rapálogo AP21967 como dimerizador. La administración diaria durante dos semanas de rapamicina, mediante inyección intraperitoneal, a ratones a los que se había practicado una fractura de fémur indujo un retraso de la consolidación, muy probablemente debido a su efecto inhibitorio sobre la proliferación de osteoblastos, células endoteliales y del periostio, así como sobre la producción de VEGF, lo que afectó a la neovascularización del callo de fractura. Sin embargo, cuando la administración diaria se prolongó a cinco semanas, la rapamicina no mostró efecto deletéreo alguno, siendo el grado de regeneración ósea similar al de animales tratados con vehículo (Holstein y col., 2008). La aceleración tardía del proceso de consolidación se relacionó con la supresión de la actividad de células T en el callo de fractura. Por otro lado, Koh y col. (2006) sobreexpresaron BMP-2 en un defecto óseo, utilizando un sistema que depende únicamente de la administración de dimerizador. La administración intraperitoneal de rapamicina cada dos días durante 6 semanas dio lugar a la formación de hueso bien integrado con los bordes de la osteotomía. Dados estos antecedentes, en nuestros experimentos *in vivo* decidimos emplear rapamicina como agente dimerizador. La alternativa, el rapálogo AP21967, presenta una actividad dimerizadora 25 veces menor que la de la rapamicina (Robinson y col., 2013). De hecho, en nuestros experimentos *in vitro* se necesitaron concentraciones 15 veces superiores del rapálogo que de rapamicina para alcanzar niveles similares de secreción de BMP-2. Finalmente, la vida media de

este rapálogo en el plasma de ratón es menor a 4 h, significativamente más corta que la de la rapamicina (Sebastian y col., 2016; Wu y col., 2015). Los datos mostrados en esta memoria indican que la administración intraperitoneal de dos dosis de rapamicina al cabo de 1 y 8 días tras la generación de la lesión no impidió la formación de hueso nuevo. En trabajos futuros se estudiará si el uso de AP21967 representa una ventaja para mejorar la capacidad regenerativa de la BMP-2 inducida mediante la tecnología que hemos desarrollado, por ejemplo, acelerando la formación de nuevo tejido mineralizado en las lesiones óseas o incrementando su formación.

Trabajos existentes en la literatura indican que una elevación de temperatura podría estimular *in vitro* la proliferación y/o diferenciación de los precursores de los osteoblastos, sugiriendo que el tratamiento térmico favorece la regeneración ósea (Shui y col., 2001; Nørgaard y col., 2006). Con el fin de dilucidar si el incremento de temperatura que induce la irradiación NIR afectaba al fenotipo de las células incluidas en los hidrogeles fototérmicos, se realizó un estudio comparativo del transcriptoma de dichas células tras ser sometidas a dos rondas de irradiación NIR en ausencia de dimerizador. Los resultados obtenidos indicaron que el estímulo térmico inducido por la irradiación no afecta los niveles de expresión de genes relacionados con la proliferación o con la adquisición de un fenotipo diferenciado. Sin embargo, similares análisis comparativos realizados en células incluidas en hidrogeles irradiados o no en presencia de dimerizador revelaron un potente efecto autocrino del factor de crecimiento en las células que sobreexpresan BMP-2, como lo demuestra la inducción de genes relacionados con el ciclo celular. De acuerdo con datos publicados previamente sobre el papel antiviral de las proteínas de la familia de las BMP (Olsavszky y col., 2017; Eddowes y col., 2019), la respuesta autocrina a las BMP-2 se caracterizó asimismo por un incremento de la expresión de genes relacionados con las respuestas a virus y asociadas al interferón. En algunas publicaciones recientes se ha postulado que la estimulación térmica *in vivo* de materiales sensibles al magnetismo o al NIR, que se implantaron en defectos tibiales generados en ratas o conejos, favorece la regeneración ósea (Ota y col., 2017; Tong y col., 2019). Con el fin de averiguar si el tratamiento térmico podría contribuir a la

regeneración observada en nuestro modelo experimental, implantamos hidrogeles fototérmicos desprovistos de células en los defectos generados en calvaria de ratón. No hemos evidenciado formación ósea alguna después de irradiar los implantes fototérmicos, lo que resalta el papel esencial de la BMP-2 secretada tras el protocolo de activación. Es importante señalar que mientras la implantación de los materiales descritos en los trabajos de Ota y col. (2017) y Tong y col. (2019) dieron lugar a cierto grado de osificación en ausencia de estímulo térmico, en nuestro trabajo no hemos evidenciado regeneración ósea tras implantar hidrogeles conteniendo o no células que no fueron activados mediante irradiación NIR. Queda por determinar si las características intrínsecas de los diferentes biomateriales pueden jugar un papel decisivo en la respuesta tisular a la elevación de temperatura. No se puede descartar la posibilidad de que las características inherentes a los huesos planos o largos regulen de forma diferente la respuesta al estímulo térmico, ya que Ota y col. (2017) y Tong y col. (2019) colocaron implantes sensibles al magnetismo y a NIR en un hueso largo que sufre osificación endocondral, mientras que nosotros hemos estudiado la regeneración del hueso parietal, que se forma mediante osificación intramembranosa. Por último, no puede excluirse que las características específicas del tejido óseo de cada una de las especies examinadas determinen su respuesta a la elevación de temperatura. Por ejemplo, el hueso de ratón carece de un verdadero sistema de canales de Havers (Holstein y col., 2009), el hueso de conejo se caracteriza por un bajo porcentaje de hueso trabecular (Macedo y col., 2019), mientras que la composición bioquímica del hueso de rata se aleja remarcablemente de la de mamíferos superiores (Bighma-Sadegh y col., 2015).

Entre los modelos ortotópicos preclínicos disponibles para evaluar la viabilidad de las estrategias de regeneración ósea, los defectos generados en calvaria ofrecen varias ventajas sobre los defectos de huesos largos (McGovern y col., 2018). En primer lugar, no se requiere estabilización ni externa ni interna ya que la piel y la duramadre ofrecen soporte para los implantes. Además, la estructura ósea de la calvaria facilita la generación de defectos estandarizados, lo que permite una comparación precisa entre los resultados de experimentos

independientes. Debido a su origen durante el desarrollo, los huesos craneofaciales resultan más difíciles de regenerar que los huesos largos (Tian y col., 2018). Cabe señalar que muchas estrategias de reconstrucción utilizadas para tratar grandes defectos craneales en pacientes adultos no son adecuadas para los pacientes pediátricos, que, debido a su desarrollo, a menudo requieren múltiples cirugías. Por lo tanto, se puede anticipar una oportunidad terapéutica para la estrategia que presentamos en este estudio, que combina tecnologías de ingeniería de tejidos y de terapia génica para abordar la reconstrucción craneal.

En resumen, hemos demostrado que la sobreexpresión deliberada de BMP-2 en intermediarios tisulares sensibles a NIR tras su implantación en un defecto óseo puede emular los mecanismos de reparación de los tejidos endógenos. Si bien el presente estudio ofrece la prueba de concepto para la aplicación de la irradiación NIR como medio para inducir expresión transgénica destinada a regenerar el tejido óseo, es necesario seguir optimizando esta tecnología para lograr la formación de nuevo hueso plenamente funcional. En futuros trabajos se determinará si los hidrogeles de fibrina sensibles a NIR pueden inducir eficazmente la regeneración ósea en defectos de huesos largos y si otros sustratos que responden a NIR, distintos de los hidrogeles basados en la fibrina utilizados en el presente trabajo, mejoran la regeneración ósea promovida por la BMP-2 transgénica mediante un efecto térmico aditivo. Así, la plataforma que hemos desarrollado no quedaría restringida a nanomateriales fototérmicos específicos o a una composición determinada del intermediario tisular, sino que podría expandirse a otros materiales. Asimismo, puede perfeccionarse hacia estrategias de terapia génica *in vivo* que empleen vectores virales que codifiquen el circuito génico activado por calor y dependiente de rapamicina. En esta aproximación, el hidrogel o biomaterial sensible a NIR serviría tanto de reservorio de los vectores que transportan el circuito a las células del hospedador, como de fuente de hipertermia local para permitir la inducción transgénica tras irradiación. La activación inadvertida de la expresión transgénica a partir del vector viral que pudiera diseminarse desde el material y acceder a órganos principales podría excluirse categóricamente, ya que el circuito génico no puede activarse en ausencia de administración de un dimerizador y activación local por calor.

En la segunda parte de este trabajo presentamos un método que facilita la preparación de hidrogeles de fibrina empleando HGNP acopladas a trombina. El protocolo de acoplamiento de la trombina dio lugar a nanopartículas fototérmicas, capaces de absorber la luz NIR y transformarla en calor. La estabilidad de la conjugación de trombina a las partículas se determinó cuantificando los valores del potencial zeta de suspensiones acuosas de HGNPT almacenadas a 4 °C. Dichos valores experimentaron una ligera reducción al cabo de 3 días, permaneciendo estables hasta el final de periodo de observación de 7 días, lo que indica la estabilidad de la conjugación del enzima a las partículas y posibilita su preparación y almacenaje previos al momento de utilización. Sin embargo, observamos que las HGNPT experimentan cambios relevantes tras su incubación en medio acuoso a 37 °C, como lo demostró el aumento de especies coloidales con geometría irregular, así como la disminución de su capacidad fototérmica. Dado que las HGNP experimentan una importante remodelación estructural tras su conjugación con grupos amino presentes en las proteínas (Prieto y col., 2014), hipotetizamos que, a pesar de la actividad protectora del recubrimiento de PEG, la trombina conjugada a HGNP puede acelerar el proceso reductor del metal. En cuanto a la actividad funcional de la trombina, observamos que ésta se vio reducida debido al aumento de la fuerza iónica del medio en que se prepararon los hidrogeles, DMEM, que provoca la disociación de la trombina. Este resultado sugiere la existencia de un componente electrostático competitivo en la interacción del enzima con las HGNP acopladas a PLL. Se objetivó una ralentización de la polimerización de los hidrogeles de fibrina conformados con HGNPT, en comparación con los preparados con HGNP y trombina soluble. Además, la polimerización de los hidrogeles preparados con HGNPT no fue efectiva a temperaturas inferiores a 37 °C. Datos existentes en la literatura indican que la trombina inmovilizada en estructuras en bloque, como espumas de silicato mesocelular o esponjas de gelatina clínicamente relevantes, preserva una elevada actividad enzimática que conduce a cortos tiempos de coagulación sanguínea en ensayos *in vitro* (Baker y col., 2008) y a una rápida hemostasia en un modelo de sangrado porcino (Shukla y col., 2012), respectivamente. Sin embargo, cuando la trombina se acopló a

nanomagnetita, el nanocompuesto resultante dio lugar a tiempos de coagulación del plasma significativamente más lentos que los de la trombina soluble (Shabanova y col., 2018). Estas discrepancias pueden explicarse por la heterogeneidad inherente a los diferentes sistemas, que implican importantes variaciones de la difusión del enzima y por tanto a una alteración de su actividad. Nuestros resultados sugieren que la asociación de la trombina a las nanopartículas plasmónicas limita la disponibilidad del enzima, condicionando la cinética del proceso de polimerización. La estructura final de los hidrogeles de fibrina viene determinada en gran medida por factores cinéticos. Así, el auto-ensamblado de las fibras de fibrina está influenciado por la concentración de fibrinógeno y trombina (Weisel y col., 1992). Como resultado de la disminución de la concentración de trombina en el sistema los tiempos de polimerización necesariamente serán más lentos (Blomback y col., 1989; Kubota y col., 2004) y la microestructura del hidrogel, en cuanto a porosidad y tamaño de fibra, se verá afectada. Trabajos previos indican que altas concentraciones de trombina dan lugar a redes muy empaquetadas, con un número superior de haces de fibras, finas y delgadas, mientras que, al disminuir la concentración del enzima, el tamaño promedio del haz de fibras aumenta dando lugar a un hidrogel más poroso (Blomback y col., 1989; Kubota y col., 2004). La microporosidad aumenta el área específica de la superficie, mejorando así la absorción de proteínas y proporcionando un mayor número de sitios de adhesión celular. Además, la microporosidad mejora la permeabilidad del andamiaje, lo que facilita la difusión de nutrientes y residuos, así como la degradación del biomaterial tras la implantación (Perez y col., 2013; Perez y col., 2016; Zhang y col., 2018). Los hidrogeles fototérmicos preparados usando trombina soluble o HGNPT presentaron, en ambos casos, una estructura aparente altamente porosa con poros interconectados a escala micrométrica. Tal y como cabría esperar, el tamaño de los poros de los hidrogeles preparados con HGNPT fue ligeramente superior al de los hidrogeles preparados usando trombina soluble. En términos de citocompatibilidad, era esperable que estos hidrogeles proporcionasen una funcionalidad similar a la de hidrogeles preparados con trombina soluble, que permiten la supervivencia celular (Martin-Saavedra y col., 2014; Martin-Saavedra

y col., 2018). Los datos incluidos en esta memoria confirman esta hipótesis, ya que tanto la distribución de las células en el hidrogel como su actividad metabólica fue indistinguible en hidrogeles preparados con HGNPT o con trombina soluble. Además, los hidrogeles preparados con HGNPT se degradaron de forma similar que los preparados con trombina soluble, como indicaron los ensayos de actividad fibrinolítica realizados *in vitro*. En cuanto a la capacidad fototérmica de los hidrogeles preparados con HGNPT, observamos que era ligeramente menor que la de hidrogeles preparados con trombina soluble e idénticas cantidades de HGNP. No obstante, comprobamos que la eficiencia fototérmica de los hidrogeles preparados con HGNPT podía ser modulada incrementando la concentración de HGNPT en la mezcla precursora, hasta sobrepasar la eficiencia de hidrogeles preparados con trombina soluble. La actividad fototérmica de los intermediarios tisulares generados con HGNPT es suficiente para desencadenar tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad fLuc en células C3H/10T1/2-fLuc incluidas en los mismos. Hipotéticamente, la lenta polimerización *in situ* de la fibrina que promueven las HGNPT podría conducir, una vez inyectada la mezcla precursora, a una mayor dispersión del hidrogel en el espacio subcutáneo, dando lugar a menores niveles de expresión transgénica tras la activación del circuito génico. Sin embargo, este fenómeno no fue observado en nuestros estudios, en los que se objetivó un grado similar de actividad fLuc en implantes preparados con HGNPT o trombina soluble.

Queda por determinar si la estabilidad térmica de los implantes preparados con HGNPT permitiría reinducir la actividad transgénica tras sucesivas rondas de irradiación, tal y como se observa en implantes preparados con HGNP y trombina soluble (Martín-Saavedra y col., 2014). La fragmentación acelerada de HGNPT en medio acuoso que se ha observado *in vitro* podría influir en el comportamiento fototérmico *in vivo* de los intermediarios celulares que contienen el nanocompuesto plasmónico. En trabajos futuros se abordará la respuesta a largo plazo de los intermediarios plasmónicos preparados con HGNPT y se objetivará si la fragmentación del nanomaterial plasmónico podría ayudar a reducir su tamaño a niveles que permitan su eliminación mediante mecanismos fisiológicos.

En resumen y para concluir, la inmovilización de la trombina en HGNP ha dado lugar a un nanocompuesto almacenable, que facilita la preparación y la administración directa de andamiajes celulares fototérmicos inyecta

CONCLUSIONES

De todo lo expuesto, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En presencia de agente dimerizador, la irradiación de hidrogeles fototérmicos con un láser que emite en el infrarrojo cercano induce la secreción de BMP-2 transgénica en células murinas que albergan un circuito génico, activable por calor y dependiente de rapamicina, para el control de la expresión de este factor de crecimiento.
2. La BMP-2 secretada tras irradiar *in vitro* los hidrogeles fototérmicos en presencia de agente dimerizador presenta una potente actividad autocrina y paracrina.
3. Es posible inducir la producción de BMP-2 en hidrogeles fototérmicos implantados en defecto críticos generados en calvaria de ratón, tras administración de rapamicina e irradiación de la zona implantada. La BMP-2 secretada tras la activación de los hidrogeles dio lugar a la formación de tejido mineralizado en la lesión.
4. La funcionalización de la superficie de nanopartículas huecas de oro empleando polietilenglicol como enlazador heterobifuncional permite acoplar trombina al nanomaterial. El acoplamiento de trombina a las nanopartículas huecas de oro no altera la eficiencia fototérmica de las nanopartículas resultantes.
5. Es posible preparar hidrogeles fototérmicos de fibrina utilizando nanopartículas huecas de oro acopladas a trombina. Los hidrogeles fototérmicos resultantes son biocompatibles y posibilitan la inducción de la expresión transgénica tras irradiación en presencia de rapamicina, tanto *in vitro* como *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham RT. (1998) Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol*, 10: 330-336.

Abu-Salah KM, Ansari AA, Alrokayan SA. (2010) DNA-Based applications in Nanobiotechnology. *J Biomed Biotechnol*, 715295.

Ahmad MZ, Akhter S, Rahman Z, Akhter S, Anwar M, Mallik N, Ahmad FJ. (2012) Nanometric gold in cancer nanotechnology: current status and future prospect. *J Pharm Pharmacol*, 65: 634-651.

Ai-Aql ZS, Alagil AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, 87: 107-118.

Allemann IB, Kaufman J. (2011) Laser principles. *Curr Probl Dermatol*, 42: 7-23.

Alvarez-Garcia O, Carbajo-Perez E, Garcia E, Gil H, Molinos I, Rodriguez J, Ordoñez FA, Santos F. (2007) Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats. *Pediatr Nephrol*, 22: 954-961.

Aryal R, Chen, XP, Fang C, Hu YC. (2014) Bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in bone tissue regeneration: new insight and perspectives. *Orthop Surg*, 6: 171-178.

Axelrad TW, Steen B, Lowenberg DW, Creevy WR, Einhorn TA. (2008) Heterotopic ossification after use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. *J Bone Joint Surg Br*, 90: 1617-1622.

Bae MS, Ohe JY, Lee JB, Heo DN, Byun W, Bae H, Kwon YD, Kwon IK. (2013) Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing growth and differentiation factor 5 (GDF-5) for bone tissue regeneration. *Bone*, 59: 189-198.

Baker SE, Sawvel AM, Fan J, Shi Q, Strandwitz N, Stucky GD. (2008) Blood clot initiation by mesocellular foams: dependence on nanopore size and enzyme immobilization. *Langmuir*, 24: 14254-14260.

Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ. (2005) Characterization of the FKBP.rapamycin. FRB ternary complex. *J Am Chem Soc*, 127: 4715-4721.

Bao Z, Gao M, Sun Y, Nian R, Xian M. (2020) The recent progress of tissue adhesives in design strategies, adhesive mechanism and applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 111: 110796.

Beck C, Uramoto H, Boren J, Akyurek LM. (2004) Tissue-specific targeting for cardiovascular gene transfer. Potential vectors and future challenges. *Curr Gen Ther*, 4: 454-467.

Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Nami S, Mehrzadi S, Shakeri-Zadeh A, Kamrava SK. (2016) Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced application. *J Control Release*, 235: 205-221.

Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Egermann M, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Vrahas MS, Bouxsein ML, Evans CH. (2007) Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther*, 14: 1039-1044.

Betz VM, Betz OB, Glatt V, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Bouxsein ML, Vrahas MS, Evans CH. (2007) Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose. *Hum Gene Ther*, 18: 907-915.

Bellacen K, Lewis EC. (2009) Aortic Ring Assay. *J Vis Exp*, 33: e1564.

Berger AC, Wang XQ, Zalatoris A, Cenna J, Watson JC. (2004) A murine model of ex vivo angiogenesis using aortic disks grown in fibrin clot. *Microvasc Res*, 68: 179-187.

Bhatt RA, Rozental TD. (2012) Bone graft substitutes. *Hand Clin*, 28: 457-468.

Biggs, R. (1976) *Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis*. Blackwell Scientific Publications 2nd ed., 722.

Bigham-Sadegh A, Oryan A. (2015) Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res*, 56: 175-194.

Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta*, 997: 96-110.

Blomback B, Bark N. (2004) Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophys Chem*, 112: 147-151.

Bramson JL, Hitt M, Gauldie J, Graham FL. (1997) Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther*, 4: 1069-1076.

Brenner S, Horne RW. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta*, 34: 103-110.

Carroll L, Humphreys TR. LASER-tissue interactions. (2006) *Clin Dermatol*, 24: 2-7.

- Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B. (2006) Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels *in vitro*. Tissue Eng, 12: 2385-2396.
- Cebrián V, Martín-Saavedra F, Gómez L, Arruebo M, Santamaria J, Vilaboa N. (2013) Enhancing of plasmonic photothermal therapy through heat-inducible transgene activity. Nanomedicine, 9: 646-656.
- Chanika P, Lee M, Voigt C, Wu KY, Ehrlich MG, Gruppuso PA, Chen Q. (2009) The effect of rapamycin on bone growth in rabbits. J Orthop Res, 27: 1157-1161.
- Chang KJ, Reid T, Senzer N, Swisher S, Pinto H, Hanna N, Chak A, Soetikno R. (2012) Phase I evaluation of TNFerade biologic plus chemoradiotherapy before esophagectomy for locally advanced resectable esophageal cancer. Gastrointest Endosc, 75: 1139-1146.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. (2004) Bone morphogenetic proteins. Growth Factors, 22: 233-241.
- Chen J, Long F. (2018) mTOR signaling in skeletal development and disease. Bone Res, 6: 1.
- Chen J, Yang B, Zhang S, Ling Y, Ye J, Jia Z, Cao J. (2012) Antitumor potential of SLPI promoter controlled recombinant caspase-3 expression in laryngeal carcinoma. Cancer Gene Ther, 19: 328-335.
- Chen Y, Lebrun JJ, Vale W. (1996) Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian *Mad* proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 12992-12997.
- Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS. (2009) Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. Nanoscale Res Lett, 8: 858-864.

Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24: 237-259.

Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. (2011) Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 40: 44-56.

Compston JE. (2003) Osteoporosis after liver transplantation. *Liver Transplant*, 9: 321-330.

Court-Brown CM, Biant L, Bugler KE, McQueen MM. (2014) Changing epidemiology of adult fractures in Scotland. *Scott Med J*, 59: 30-34.

Dariva CG, Coelho JFJ, Serra AC. (2019) Near infrared light-triggered nanoparticles using singlet oxygen photocleavage for drug delivery systems. *J Control Release* 2019, 294: 337-354.

Deckers R, Quesson B, Arsaut J, Eimer S, Couillaud F, Moonen CT. (2009) Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 27: 1175-1180.

Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei Y. (2009) Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and *Arabidopsis thaliana*. *Dev Growth Differ* 2009, 51: 769-775.

De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29: 1912-1919.

Dimitriou R, Dahabreh Z, Katsoulis E, Matthews SJ, Branfoot T, Giannoudis PV. (2005) Application of recombinant BP-7 on persistent upper and lower limb non-unions Injury, 36 Suppl 4: S51-S59.

Driessen JHM, Hansen L, Eriksen SA, Van Onzenoort HAW, Henry RMA, Van den Bergh J, Abrahamsen B, Vestergaard P, De Vries F. (2016) The epidemiology of fractures in Denmark in 2011. Osteoporos Int, 27: 2017-2025.

Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. (2010) Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. Nat Nanotechnol, 6: 13-22.

Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, Fioretti F, Mainard D, Ladam G, Benkirane-Jessel. (2014) Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. Nanomedicine Lond, 9: 1253-1261.

Eddowes LA, Al-Hourani K, Ramamurthy N, Frankish J, Baddock HT, Sandor C, Ryan JD, Fusco DN, Arezes J, Giannoulatou E, Boninsegna S, Chevaliez S, Owens BMJ, Sun CC, Fabris P, Giordani MT, Martines D, Vukicevic S, Crowe J, Lin HY, Rehwinkel J, McHugh PJ, Binder M, Babitt JL, Chung RT, Lawless MW, Armitage AE, Webber C, Klenerman P, Drakesmith H. (2019) Antiviral activity of bone morphogenetic proteins and activins. Nat Microbiol, 4: 339-351.

Einhorn TA. (2003) Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. J Bone Joint Surg Am, 85-A Suppl 3: 82-88.

Escudero-Duch C, Martin-Saavedra F, Prieto M, Sanchez-Casanova S, Lopez D, Sebastian V, Arruebo M, Santamaría J, Vilaboa N. (2019) Gold nanoparticles for the in situ polymerization of near-infrared responsive hydrogels based on fibrin. Acta Biomater, 100: 306-315.

Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirouskova M, Soloviev DA, Busuttill SJ, Plow EF, Degen JL. (2004) Leukocyte engagement of fibrinogen via the integrin receptor α M β 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest*, 113: 1596-1606.

Franck P, Henderson PW, Rothaus KO. (2016) Basics of lasers: history, physics and clinical applications. *Clin Plast Surg*, 43: 505-513.

Fujita S, Arai Y, Nakagawa S, Takahashi KA, Terauchi R, Inoue A, Tonomura H, Hiraoka N, Inoue H, Tsuchida S, Mazda O, Kubo T. (2012) Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration-induced HSP70 expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model. *J Orthop Res*, 30: 401-407.

Gafni Y, Pelled G, Zilberman Y, Turgeman G, Apparailly F, Yotvat H, Galun E, Gazit Z, Jorgensen C, Gazit D. (2004) Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2- based gene expression system. *Mol Ther*, 9: 587-595.

Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, Song F. (2007) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol Assess*, 11: 1-150.

Geuze RE, Theyse LF, Kempen DH, Hazewinkel HAW, Kraak HYA, Oner FC, Dhert WJA, Alblas J. (2012) A differential effect of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor release timing on osteogenesis at ectopic and orthotopic sites in a large-animal model. *Tissue Eng Part A*, 18: 2052-2062.

Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. (2018) Current Concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Arch Bone Jt Surg*, 6: 90-99.

Giannoudis PV, Psarakis S, Kanakaris NK, Pape HC. (2007) Biological enhancement of bone healing with bone morphogenetic protein-7 at the clinical setting of pelvic girdle non-unions. *Injury*, 38 Suppl 4: S43-S48.

Goh KL, Holmes DF. (2017) Collagenous extracellular matrix biomaterials for tissue engineering: lessons from the common sea urchin tissue. *Int J Mol Sci*, 18: 901.

Gomez L, Sebastian V, Irusta S, Ibarra A, Arruebo M, Santamaria J. (2014) Scaled-up production of plasmonic nanoparticles using microfluidics: from metal precursors to functionalized and sterilized nanoparticles. *Lab Chip*, 14: 325-332.

Gorskaya YF, Danilova TA, Mezentseva MV, Shapoval IM, Grunina TM, Bartov MS, Karyagina AS, Lunin VG, Chailakhyan, Kuralesova AI, Gerasimov YV, Nesterenko VG. (2013) Effect of BMP-2 protein on the count and osteogenic properties of multipotent stromal cells and expression of cytokine genes in primary cultures of bone marrow and spleen cells from CBA mice immunized with bacterial antigens. *Bull Exp Biol Med*, 155: 650-654.

Gould DJ, Chernajovsky Y. (2004) Endogenous GATA factors bind the core sequence of the tetO and influence gene regulation with the tetracycline system. *Mol Ther*, 10: 127-138.

Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentine-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Börner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, Van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reyneders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Rüter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T. (2012) BMP-2 evaluation in surgery for tibial

trauma study group. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*, 84: 2123-2134.

Groeneveld EH, Burger EH. (2000) Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142: 9-21.

Griffin RJ, Dings RP, Jamshidi-Parsian A, Song CW. (2010) Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: Role of tumor vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int J Hyperth*, 26: 256-263.

Guilhon E, Voisin P, de Zwart JA, Quesson B, Salomir R, Maurange C, Bouchaud V, Smirnov P, de Verneuil H, Vekris A, Canioni P, Moonen CTJ. (2003) Spatial and temporal control of transgene expression *in vivo* using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. *Gene Med*, 5: 333-342.

Guo L, Panderi I, Yan, K. Szulak DD, Li Y, Chen YT, Ma H, Niesen DB, Seeram N, Ahmed A, Yan B, Pantazatos D, Lu W. (2013) A comparative study of hollow copper sulfide nanoparticles and hollow gold nanospheres on degradability and toxicity. *ACS Nano*, 7: 8780-8793.

Hakkinen H. (2012) The gold–sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem*, 4: 443-455.

Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira KMC, Barker JH. (2018) Histological scoring method to assess bone healing in critical size bone defect models. *Tissue Eng Part C Methods*, 24: 272-279.

Hanamura H, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Nogami H, Urist MR. (1980) Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*, 148: 281-290.

Hecht JR, Farrell JJ, Senzer N, Nemunaitis J, Rosemurgy A, Chung T, Hanna N, Chang KJ, Javle M, Posner M, Waxman I, Reid A, Erickson R, Canto M, Chak A, Blatner G, Kovacevic M, Thornton M. EUS or percutaneously guided intratumoral TNFerade biologic with 5-fluorouracil and radiotherapy for first-line treatment of locally advanced pancreatic cancer: a phase I/II study. *Gastrointest Endosc*, 75: 332-338.

Helgeson MD, Lehman Jr RA, Patzkowski JC, Dmitriev AE, Rosner MK, Mack AW. (2011) Adjacent vertebral body osteolysis with bone morphogenetic protein use in transforaminal lumbar interbody fusion. *Spine J*, 11: 507-510.

Hernandez A, Reyes R, Sanchez E, Rodriguez-Evora M, Delgado A, Evora C. (2012) *In vivo* osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res Part A*, 100: 2382-2391.

Hill ZB, Martinko AJ, Nguyen DP, Wells JA. (2018) Human antibody-based chemically induced dimerizers for cell therapeutic applications. *Nat Chem Biol*, 14: 112-117.

Hillen W, Wissman A. (1989) Tet repressor-tet operator interaction, en *Protein-Nucleic Acid Interaction*. Topics in Molecular and Structural Biology. Saenger W., Heinemann U. (Eds), Palgrave, London.

Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T, Menger MD. (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol*, 154: 1055-1062.

Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T. (2009) Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma*, 23: S31-S38.

Hoppe B. (2014) Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost*, 112: 649-658.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4: 44-57.

Hurwitz MD. (2010) Today's thermal therapy: Not your father's hyperthermia: Challenges and opportunities in application of hyperthermia for the 21st century cancer patient. *Am J Clin Oncol*, 33: 96-100.

Indraccolo S, Moserle L, Tisato V, Gola E, Minuzzo S, Roni V, Persano L, Chieco-Bianchi L, Amadori A. (2006) Gene therapy of ovarian cancer with IFN-alpha-producing fibroblasts: comparison of constitutive and inducible vectors. *Gene Ther*, 13: 953-965.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger P. (2010) Neoadjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localized high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol*, 11: 561-570.

Jacque D, Martínez Maestro L, del Rosal B, Haro-González P, Benayas A, Plaza JL, Martín Rodríguez E, García Solé J. (2014) Nanoparticles for photothermal therapies *Nanoscale*, 6: 9494-9530.

Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH. (2008) *In vivo* bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A*, 14: 1285-1294.

Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Distal metaphyseal tibial nonunion. (1990) Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). *Clin Orthop Relat Res*, 250: 234-240.

Jones CM, Lyons KM, Hogan BL. (1991) Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, 111: 531-542.

Kim BS, Sung HM, You HK, Lee J. (2014) Effects of fibrinogen concentration on fibrin glue and bone powder scaffolds in bone regeneration. *J Biosci Bioeng*, 118: 469-475.

Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. (2007) Review: gene and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng*, 13: 1135-1150.

Koh JT, Ge C, Zhao M, Wang Z, Krebsbach PH, Zhao Z, Franceschi RT. (2006) Use of a stringent dimerizer-regulated gene expression system for controlled BMP2 delivery. *Mol Ther: J Am Soc Gene Ther*, 14: 684-691.

Konermann S, Brigham MD, Trevino A, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. (2013) Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500: 472-476.

Kubota K, Kogure H, Masuda Y, Toyama Y, Kita R, Takahashi A, Kaibara M. (2004) Gelation dynamics and gel structure of fibrinogen. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 38: 103-109.

Kumar R, Maitra AN, Patanjali PK, Sharma P. (2005) Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials*, 26: 6743-6753.

Lakshman S, Aqua K, Stefanovic A, Djurdjevic S, Nyirády P, Osváth P, Davis R, Bullock A, Chen J, Ibañez J, Barrera G, Navarro-Puerto J. (2020) Fibrin Sealant Grifols in Soft Tissue Surgery Study Clinical Investigation Group. A prospective, single-blind, randomized, phase III study to evaluate the safety and efficacy of fibrin sealant Grifols as an adjunct to hemostasis during soft tissue open surgery. *J Invest Surg*, 33: 218-230.

Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD. (2006) Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol*, 149: 137-44.

Langer R, Vacanti JP. (1993) Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926.

Lee KW, Yook JY, Son MY, Kim MJ, Koo DB, Han YM, Cho YS. (2010) Rapamycin promotes the osteoblastic differentiation of human embryonic stem cells by blocking the mTOR pathway and stimulating the BMP/Smad pathway. *Stem Cells Dev*, 19: 557-568.

Lee MC, Bier AD, Nickisch F, Eberson CP, Ehrlich MG, Chen Q. (2007) Epiphysiodesis with infusion of stromal cell-derived factor-1 in rabbit growth plates. *J Bone Joint Surg Am*, 89: 102-113.

Li Z, Ding Q, Li Y, Miller SA, Abbruzzese JL, Hung MC. (2006) Suppression of pancreatic tumor progression by systemic delivery of a pancreatic-cancer-specific promoter driven Bik mutant. *Cancer Lett*, 236: 58-63.

Liang J, Choi J, Clardy J. (1999) Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 angstrom resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55: 736–744.

Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, Kabo JM, Finerman GA, Berk AJ, Witte ON. (1999) The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2 producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am*, 81: 905-917.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 84: 1032-1044.

Li P, Shi YW, Li BX, Xu WC, Shi Z, Zhou C, Fu S. (2015) Photothermal effect enhances the efficiency of radiotherapy using Arg-Gly-Asp peptides-conjugated gold nanorods that target $\alpha v \beta 3$ in melanoma cancer cells. *J Nanobiotechnology*, 28: 13-52.

Liu T, Tian J, Chen Z, Liang Y, Liu J, Liu S, Li H, Zhan J, Yang X. (2014) Anti-TROP2 conjugated hollow gold nanospheres as a novel nanostructure for targeted photothermal destruction of cervical cancer cells. *Nanotechnology*, 25: 345103.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402-408.

Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Field MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. (1995) Activation of heat-shock factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol*, 268: 1387-1394.

Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. (2008) Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine*, 3: 703-717.

Lowery JW, de Caestecker MP. (2010) BMP signaling in vascular development and disease Cytokine Growth. Factor Rev, 21: 287-298.

Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. (1990) Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). Development, 109: 833-844.

Macedo AS, Feitosa CC, Kawamoto FYK, Vinicius P, Marinho T, Dal-Bó IDS, Monteiro BF, Prado L, Bregadioli T, Diamante GAC, Ferrigno CRA. (2019) Animal modeling in bone research-Should we follow the white rabbit?. Animal Model Exp Med, 2: 162-168.

Maiman TH. (1960) Stimulated optical radiation in ruby. Nature, 187:493-494.

Martín-Saavedra FM, Boré A, Voellmy R, Vilaboa N. (2009) Heat-activated, rapamycin-dependent gene switches for tight control of transgene expression. Hum Gene Ther, 20:1060-1061.

Martín-Saavedra FM, Wilson CG, Voellmy R, Vilaboa N, Franceschi RT. (2013) Spatiotemporal control of vascular endothelial growth factor expression using a heat-shock-activated, rapamycin-dependent gene switch. Hum Gene Ther Methods, 24: 160-170.

Martin-Saavedra FM, Cebrian V, Gomez L, Lopez D, Arruebo M, Wilson CG, Franceschi RT, Voellmy R, Santamaria J, Vilaboa N. (2014) Temporal and spatial patterning of transgene expression by near-infrared irradiation. Biomaterials, 35: 8134-8143.

Martín-Saavedra F, Ruiz-Hernández E, Escudero-Duch C, Prieto M, Arruebo M, Sadeghi N, Deckers R, Storm G, Hennink WE, Santamaría J, Vilaboa N. (2017) Lipogels responsive to near-infrared light for the triggered release of therapeutic agents. Acta Biomater, 61: 54-65.

Martín-Saavedra F, Escudero-Duch C, Prieto M, Sanchez-Casanova S, Lopez D, Arruebo M, Voellmy R, Santamaría J, Vilaboa N. (2018) Pro-angiogenic near infrared-responsive hydrogels for deliberate transgene expression. *Acta Biomater*, 78: 123-136.

Martínez VG, Hernández-López C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, Vicente A, Sacedón R, Varas A. (2011) The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunology and Cell Biology*, 89: 610-618.

McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. (2018) Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mechan*, 11: dmm033084.

McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. (1998) Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 273: 7523-7528.

Melo LG, Gnecci M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. (2004) Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 1761-1774.

Messina M, Robinson BG. (2007) Technology insight: gene therapy and its potential role in the treatment of medullary thyroid carcinoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3: 290-301.

Mickiewicz P, Binkowski M, Bursig H, Wróbel Z. (2013) Preservation and sterilization methods of the meniscal allografts: literature review. *Cell Tissue Bank*, 2013: 1-11.

Migliario M, Sabbatini M, Mortellaro C, Renò F. (2018) Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. *J Biophotonics*, 2: e201800025.

Miyako E, Deguchi T, Nakajima Y, Yudasaka M, Hagiwara Y, Horie M, Shichiri M, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Shigeri Y, Yoshida Y, Iijima S. (2012) Photothermic regulation of gene expression triggered by laser-induced carbon nanohorns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 7523-7528.

Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147: 35-51.

Moros EG, Peñagaricano J, Novák P, Straube WL, Myerson RJ. (2010) Present and future technology for simultaneous superficial thermoradiotherapy of breast cancer. *Int J Hyperther*, 26: 699-709.

Moseley PL. (1998) Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann NY Acad Sci*, 856: 206-213.

Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, Kurkalli BG, Pelled G, Tzur L, Kelley P, Stumm N, Mi S, Müller R, Zilberman Y, Gazit D. (2001) Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther*, 3: 449-461.

Müller K, Engesser R, Metzger S, Schulz S, Kämpf MM, Busacker M, Steinberg T, Tomakidi P, Ehrbar M, Nagy F, Timmer J, Zurbiggen MD, Weber W. (2013) A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 41: e77.

Müller K, Engesser R, Schulz S, Steinberg T, Tomakidi P, Weber CC, Ulm R, Timmer J, Zurbiggen MD, Weber W. (2013b) Multi-chromatic control of mammalian gene expression and signaling. *Nucleic Acids Res*, 41: e124.

Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. (2013) Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater*, 26: 120-32.

Neef DW, Jaeger AM, Thiele DJ. (2011) Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 930-944.

Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD. (2009) Intricacies of BMP receptor assembly *Cytokine Growth Factor Rev*, 20: 367-377.

Nogami H, Oohira A. (1984) Postnatal new bone formation. *Clin Orthop Relat Res*, 184: 106-113.

Nørgaard R, M. Kassem M, Rattan SI. (2006) Heat shock-induced enhancement of osteoblastic differentiation of hTERT-immortalized mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 14: 684-91.

Norouzi H, Khoshgard K, Akbarzadeh F. (2018) In vitro outlook of gold nanoparticles in photo-thermal therapy: a literature review. *Lasers Med Sci*, 33: 917-926.

Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV. (1981) The significance of yellow bone. Evidence for tetracycline in adult human bone. *JAMA*, 246: 761-763.

Olsavszky V, Ulbrich F, Singh S, Dieltz M, Sticht C, Schmid CD, Zierow J, Wohlfeil SA, Schledzewski K, Dooley S, Gaitantzi H, Breitschopf-Heinlein K, G  rud C, Goerdts S, Koch PS. (2017) GATA4 and LMO3 balance angiocrine signaling and autocrine inflammatory activation by BMP2 in liver sinusoidal endothelial cells. *Gene*, 627: 491-499.

Ortiz de Solórzano I, Prieto M, Mendoza G, Alejo T, Irusta S, Sebastian V, Arruebo M. (2016) Microfluidic synthesis and biological evaluation of photothermal biodegradable copper sulfide nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 33: 21545-21554.

Ota T, Nishida Y, Ikuta K, Kato R, Kozawa E, Hamada S, Sakai T, Ishiguro N. (2017) Heat-stimuli enhanced osteogenesis using clinically available biomaterials. *PLoS One*, 12: e0181404.

Park DJ, Yoon C, Thomas N, Ku GY, Janjigain YY, Kelsen DP, Ilson DH, Goodman KA, Tang LH, Strong VE, Coit DG, Yoon SS. (2014) Prognostic significance of targetable angiogenic and growth factors in patients undergoing resection for gastric and gastroesophageal junction cancers. *Ann Surg Oncol*, 21: 1130-1137.

Park J, Park J, Ju EJ, Park SS, Choi J, Lee JH, Lee KJ, Shin SH, Ko EJ, Park I, Kim C, Hwang JJ, Lee JS, Song SY, Jeong SY, Choi EK. (2015) Multifunctional hollow gold nanoparticles designed for triple combination therapy and CT imaging. *J Control Release* 2015, 207: 77-85.

Park K. (2007) Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Release* 2007, 120: 1-3.

Perez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. (2013) Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 65: 471-496.

Perez RA, Mestres G. (2016) Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 61: 922-939.

Place ES, Evans ND, Stevens MM. (2009) Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*, 8: 457-470.

Pomerantz JL, Sharp PA, Pabo CO. (1995) Structure-based design of transcription factors. *Science*, 267: 93-96.

Pollock R, Clackson T. (2002) Dimerizer-regulated gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13: 459-67.

Pollock R, Issner R, Zoller K, Natesan S, Rivera VM, Clackson T. (2000) Delivery of a stringent, dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 13221-13226.

Polstein LR, Gersbach CA. (2012) Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *J Am Chem Soc*, 134: 16480-16483.

Preciado-Flores S, Wang D, Wheeler DA, Newhouse R, Hensel JK, Schwartzberg A, Wang L, Zhu J, Barboza-Flores M, Zhang JZ. (2011) Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent. *J Mater Chem*, 21: 2344-2350.

Prieto M, Arenal R, Henrard L, Gomez L, Sebastian V, Arruebo M. (2014) Morphological tunability of the plasmonic response: from hollow gold nanoparticles to gold nanorings. *J Phys Chem C*, 118: 28804-28811.

Primo K, Seano G, Roca C, Maione F, Gagliardi PA, Sessa R, Martinelli M, Giraudo E, di Blasio L, Bussolino F. (2010) Increased expression of $\alpha 6$ integrin in endothelial cells unveils a proangiogenic role for basement membrane. *Cancer Res*, 70: 5759-5769.

Reddi AH. (2001) Bone morphogenetics proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1 (Pt 1): S1-S6.

Reinisch L. (1996) Laser physics and tissue interactions. *Otolaryngol Clin North Am*, 29: 893-914.

Rivera JC, Strohbach CA, Wenke JC, Rathbone CR. (2013) Beyond osteogenesis: an *in vitro* comparison of the potentials of six bone morphogenetic proteins. *Front Pharmacol*, 4: 125.

Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F Jr, Holt DA, Gilman MA. (1996) Humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med*, 2: 1028-1032.

Robinson MS, Hirst J. (2013) Rapid inactivation of proteins by knocksideways. *Curr Protoc Biol.*, 61: 1-7.

Robson T, Hirst DG. (2003) Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol*, 2: 110-137.

Romero DF, Buchinsky FJ, Rucinski B, Cvetkovic M, Bryer HP, Liang XG, Ma YF, Jee WS, Epstein S. (1995) Rapamycin: a bone sparing immunosuppressant?. *J Bone Miner Res*, 10: 760-768.

Sakou T. (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, 22: 591-603.

Sakudo A. (2016) Near-infrared spectroscopy for medical applications: Current status and future perspectives. *Clin Chim Acta*, 455: 181-188.

Salehpour F, Cassano P, Rouhi N, Hamblin MR, De Taboada L, Farajdokht F, Mahmoudi J. (2019) Penetration of visible and near-infrared lasers and light-emitting diode light through the head tissues in animal and human species: a review of literature. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 37: 581-595.

Salminen WF Jr, Voellmy R, Roberts SM. (1997) Differential heat shock protein induction by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 1533-1540.

Sanchez-Casanova S, Martin-Saavedra FM, Escudero-Duch C, Falguera Uceda MI, Prieto M, Arruebo M, Acebo P, Fabiilli ML, Franceschi RT, Vilaboa N. (2020) Local delivery of bone morphogenetic protein-2 from near-infrared responsive hydrogels for bone tissue regeneration. *Biomaterials*, 241: 119909.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 596-603.

Sartori R, Sandri M. (2015) BMPs and the muscle-bone connection. *Bone*, 80: 37-42.

Schiller P, Amin J, Ananthan J, Brown ME, Scott WA, Voellmy R. (1988) Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human HSP70 gene. *J Mol Biol*, 203: 97-105.

Schwartzberg AM, Olson TY, Talley CE, Zhang JZ. (2006) Synthesis, characterization, and tunable optical properties of hollow gold nanospheres. *J Phys Chem B*, 110: 19935-19944.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saafeld S, Schmid B, Tinevez JY, James W, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9: 676-682.

Sebastian I AA, Joshua CN, Emma LB, Faizan AS, Nicole EC, Harpreet KB, Cassidy PP, Michelle EK, Dudley WL. (2016) Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell*, 15: 28-38.

Shabanova EM, Drozdov AS, Fakhardo AF, Dudanov IP, Kovalchuk MS, Vinogradov VV. (2018) Thrombin@Fe₃O₄ nanoparticles for use as a hemostatic agent in internal bleeding. *Sci Rep*, 8: 233.

Shastry S, Toft DO, Joyner MJ. (2002) HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand*, 175: 138-146.

Shi Y, Massagué J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus *Cell*, 113: 685-700.

Shiekh PA, Singh A, Kumar A. (2018) Oxygen-releasing antioxidant cryogel scaffolds with sustained oxygen delivery for tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6: 18458-18469.

Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM, Quail PT. (2002) A light-switchable gene promoter system. *Nat Biotechnol*, 10: 1041-1044.

Shui C, Scutt A. (2001) Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 16: 731-741.

Shukla A, Fang JC, Puranam S, Jensen FR, Hammond PT. (2012) Hemostatic multi-layer coatings. *Adv Mater*, 24: 92-96.

Singha UK., Jiang Y, Yu S, Luo M, Lu Y, Zhang J, Xiao G. (2008) Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 103: 434-446.

Stempfle HU, Werner C, Siebert U, Assum T, Wehr U, Rambeck WA. (2002) The role of tacrolimus (FK506)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation*, 73: 547-552.

Stern JM, Kibanov Solomonov VV, Sazykina E, Schwartz JA, Gad SC, Goodrich GP. (2016) Initial evaluation of the safety of nanoshell-directed photothermal therapy in the treatment of prostate disease. *Int J Toxicol*, 35: 38-46.

Suarez-Gonzalez D, Barnhart K, Migneco F, Flanagan C, Hollister SJ, Murphy WL. (2012) Controllable mineral coatings on PCL scaffolds as carriers for growth factor release. *Biomaterials*, 33: 713-721.

Szaba FM, Smiley ST. (2002) Roles for thrombin and fibrinogen in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion *in vivo*. *Blood*, 99: 1053-1059.

Tian T, Zhang T, Lin Y, Cai X. (2018) Vascularization in craniofacial bone tissue engineering. *J Dent Res*, 97: 969–976.

Tong L, Liao Q, Zhao Z, Huang H, Gao A, Zhang W, Gao X, Wei W, Guan M, Chi PK, Wang H. (2019) Near-infrared light control of bone regeneration with biodegradable photothermal osteoimplant. *Biomaterials*, 193: 1-11.

Toniatti C, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G. (2004) Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther*, 11: 649-657.

Urist MR, Strates BS. (1971) Bone morphogenetic protein. *Journal of dental research*, 50: 1392-1406.

Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, Hilibrand AS, Brower RS, Kurd MF, Appannagari A, Patel M, Fischgrund JS. (2008) The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. *Spine J*, 8: 457-465.

Venkateseshan VS, Marquet E. (1996) Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys. *Nephron*, 73: 442-449.

Vilaboa N, Boellmann F, Voellmy R. (2011) Gene switches for deliberate regulation of transgene expression: recent advances in system development and uses. *J Genet Syndr & Gene Ther*, 2: 107.

Vilaboa N, Fenna M, Munson J, Roberts SM, Voellmy R. (2005) Novel gene switches for targeted and timed expression of proteins of interest. *Mol Ther*, 12: 290-298.

Vilaboa N, Voellmy R. (2006) Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 6: 421-38.

Vilaboa N, Voellmy R. (2015) Deliberate regulation of therapeutic transgenes: recent advances in system development and uses, en *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. Smyth Templeton, N. (Ed).4th Edition, CRC press.

Bloom DC, Feller J, McAnany P, Vilaboa N, Voellmy R. (2015) Replication-competent controlled Herpes Simplex virus. *J Virol*, 89: 10668-10679.

Voellmy, R. (2004) On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones*, 9: 122-33.

Voellmy R, Ahmed A, Schiller P, Bromley P, Rungger D. (1985) Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 4949-4953.

Voellmy R, Bloom DC, Vilaboa N. (2015) A novel approach for addressing diseases not yielding to effective vaccination? Immunization by replication-competent controlled virus. *Expert Rev Vaccines*, 14: 637-51.

Voellmy R, Bloom DC, Vilaboa N. (2020) Herpes simplex viruses whose replication can be deliberately controlled as candidate vaccines. *Vaccines* (Basel), 8: E230.

Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Francetic I, Domic-calic I y col. (2014) The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device osteogrow for bone healing. *Int Orthop*, 38: 635-647.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel D, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P y col. (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 2220-2224.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. (2014) Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*, 1: 87-105.

Wang Y, Chen J, Tang W, Yapping Z, Li X. (2017) Rapamycin inhibits the proliferation of endothelial cells in hemangioma by blocking the mTOR-FABP4 pathway. *Biomed Pharmacother*, 85: 272-279.

Wang Y, Demayo FJ, Tsai SY, OTMalley BW. (1997) Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, 15: 239-243.

Wang X, Chen X, Yang Y. (2012) Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 9: 266-269.

Wang Z, Sun J, Qiu Y, Li W, Guo X, Li Q, Zhang H, Zhou J, Du Y, Yuan H, Hu F, You J. (2015) Specific photothermal therapy to the tumors with high EphB4 receptor expression. *Biomaterials*, 68: 32-41.

Wehling P. (2001) Transfer of genes to intervertebral disc cells: proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Joint Bone Spine*; 68: 554-556.

Weichselbaum RR, Kufe D. (2009) Translation of the radio- and chemoinducible TNFerade vector to the treatment of human cancers. *Cancer Gene Ther*, 16: 609-619.

Weisel JW, Nagaswami C. (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*, 63: 111-128.

Weisel JW, Litvinov RI. (2017) Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem*, 82: 405-456.

Weissleder R. (2001) A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol*, 19: 316-317.

Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. (1999) Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*, 367: S95-106.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528-1534.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370: 341-347.

Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. (2015) Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*, 350: aab4077.

Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. (2018) Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 15: 1-30.

Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. (2011) A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*, 332: 1565-1568.

Yeh LC, Ma X, Ford JJ, Adamo ML, Lee JC. (2013) Rapamycin inhibits BMP-7-induced osteogenic and lipogenic marker expressions in fetal rat calvarial cells. *J Cell Biochem*, 114: 1760-1771.

Yeh YC, Creran B, Rotello VM. (2012) Gold Nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 21: 1871-1880.

You J, Zhou J, Zhou M, Liu Y, Robertson JD, Liang D, Van Pelt C, Li C. (2014) Pharmacokinetics, clearance, and biosafety of polyethylene glycol-coated hollow gold nanospheres. *Part Fibre Toxicol*, 11: 26.

You J, Zhang R, Zhang G, Zhong M, Liu Y, Van Pelt CS, Liang D, Wei W, Sood AK, Li C. (2012) Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release. *J Control Release*, 158: 319-328.

Yu BF, Wu J, Zhang Y, Sung HW, Xie J, Li RK. (2013) Ultrasound-targeted HSVtk and Timp3 gene delivery for synergistically enhanced antitumor effects in hepatoma. *Cancer Gene Ther*, 20: 290-297.

Zhang K, Fan Y, Dunne N, Li X. (2018) Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regen Biomater*, 5: 115-124.

Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. (2016) BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*, 7: 78206-78218.

Zellin G. (1998) Growth factors and bone regeneration. Implications of barrier membranes. *Swed Dent J Suppl*, 129: 7-65.

APÉNDICE

Los datos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido empleados en la elaboración de las siguientes publicaciones científicas:

Escudero-Duch C, Martin-Saavedra F, Prieto M, Sanchez-Casanova S, Lopez D, Sebastian V, Arruebo M, Santamaria J, Vilaboa N. (2019) Gold nanoparticles for the *in situ* polymerization of near-infrared responsive hydrogels based on fibrin. *Acta Biomater*, 100: 306-215.

Sanchez-Casanova S, Martin-Saavedra FM, Escudero-Duch C, Falguera Uceda MI, Prieto M, Arruebo M, Acebo P, Fabiilli ML, Franceschi RT, Vilaboa N. (2020) Local delivery of bone morphogenetic protein-2 from near-infrared responsive hydrogels for bone tissue regeneration. *Biomaterials*, 241: 119909.

Además, durante la realización de esta Tesis se ha colaborado en la elaboración de las siguientes publicaciones científicas:

Martín-Saavedra F, Escudero-Duch C, Prieto M, Sánchez-Casanova S, López D, Arruebo M, Voellmy R, Santamaría J, Vilaboa N. (2018) Pro-angiogenic near infrared-responsive hydrogels for deliberate transgene expression. *Acta Biomater*, 15: 123-136.

Nakal-Chidiac A, García O, García-Fernández, Martín-Saavedra FM, Sánchez-Casanova S, Escudero-Duch C, San Román J, Vilaboa N, Aguilar MR. (2020) Chitosan-stabilized silver nanoclusters with luminescent, photothermal and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 250: 116973.